



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**TRATAMENTO DA COLITE ULCEROSA ATRAVÉS DA MANIPULAÇÃO DA
MICROBIOTA HUMANA: PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS, SIMBIÓTICOS E
TRANSPLANTE FECAL**

Trabalho submetido por
Leonor Maciel Ferreira
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Outubro de 2015



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

TRATAMENTO DA COLITE ULCEROSA ATRAVÉS DA MANIPULAÇÃO DA MICROBIOTA HUMANA : PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS, SIMBIÓTICOS E TRANSPLANTE FECAL

Trabalho submetido por
Leonor Maciel Ferreira
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof. Doutor António Cunha Monteiro

Outubro de 2015

DEDICATÓRIA

“Pedras no caminho?

Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”

Fernando Pessoa

*Aos meus pais e a minha avó, dedico todo e qualquer sucesso que tenha na vida, pois
sem eles nada seria possível*

AGRADECIMENTOS

O espaço limitado desta secção, não me permite agradecer como gostaria, a todas as pessoas que me apoiaram, incentivaram e contribuíram no sentido de concretizar mais uma etapa da minha formação académica. Desta forma, deixo apenas algumas palavras, com um profundo sentimento de reconhecimento.

*Em primeiro lugar, ao **Prof. Doutor Jorge Fonseca**, expresso o meu profundo agradecimento pela sua orientação inicial, embora não tenha sido possível continuar até à finalização.*

*Ao **Prof Doutor António Cunha Monteiro** agradeço encarecidamente por ter aceite, continuar a orientar-me.*

*Ao **Doutor António Marques** e ao **Prof. Doutor Joaquim Henriques**, por todo o seu apoio, disponibilidade, compreensão, estando sempre presentes.*

*A professoras como a **Prof Doutora Ana Clara Ribeiro**, **Carla Ascenso**, **Edite Torres**, **Perpétua Gomes**, entre outras que foram importantes tanto na formação profissional como pessoal.*

*Aos meus queridos amigos e alguns deles colegas, **Inês Santos**, **Emília Araújo**, **Nuno César Barbosa**, **Andreia Rodrigues**, **Alexandra Ribeiro**, **Bernardo Felício**, **Miguel Faria**, **Ana Marta Ferreira**, **Inês Brito Figueiredo**. Por toda a paciência, ajuda, incentivo para continuar e fé em mim mesmo quando eu não a tinha.*

RESUMO

A Colite Ulcerosa é uma doença da era “moderna” que afeta cerca de 10.4 pessoas por cada 100 000 habitantes a nível Europeu. Atualmente a Colite Ulcerosa é considerada incurável e, como muitas outras, não se sabe se é um agente individual que leva a esta exacerbação de resposta imunitária, ou se existirão mais fatores envolvidos no processo. Como se tem vindo a verificar para variadas patologias, a terapêutica existente atingiu um certo limite, a partir do qual não é eficaz para todos os doentes ou nalguns casos a doença é tão severa que se tornam refratários ou intolerantes às mesmas.

Nestes casos, é necessário explorar outras abordagens possíveis, na busca de algo que melhore a qualidade de vida e sintomatologia da doença.

A utilização de probióticos e prebióticos, possuem alguns estudos noutras patologias também do foro gastrointestinal e até alguns no âmbito da própria doença, que levam a crer que pode ser uma direção viável no auxílio da manutenção da remissão da doença ou até na indução da mesma. Os simbióticos, não possuem tanta informação disponível, como os anteriores, mas são um passo lógico, tal como se observa em muitos fármacos, o sinergismo potencia a ação terapêutica. Transplantes de matéria fecal, é um procedimento bastante antigo que tenta corrigir a disbiose diretamente, sendo de uso quotidiano em infeções como por *Clostridium difficile*.

É importante procurar novas opções, ou explorar as que resultam em patologias semelhantes. Estas poderão ser uma vertente que no mínimo melhorará a qualidade de vida dos doentes.

Palavras Chave: Tratamento; Colite Ulcerosa; Microbiota; Microbioma; Probióticos; Prebióticos; Simbióticos; Transplante de Matéria Fecal.

ABSTRACT

Ulcerative Colitis is a modern era disease, which affects about 10.4 people per 100 000 inhabitants in Europe. Nowadays Ulcerative Colitis is still incurable and like many other diseases, we don't even know if it is a single agent that leads to this exacerbated immune response.

As it has been noticed for various pathologies, the existing therapy options are becoming limited, and in some cases the patient becomes refractory or intolerant to the treatment.

Due to this aspect there is a necessity to explore other options, in search for something that will ameliorate the disease symptoms and improve the patients' quality of life.

The use of probiotics and prebiotics is referred in studies related to other gastrointestinal pathologies, and there are some which refer to this particular disease. For this reason we can believe that this is a viable direction that can help in maintaining disease remission or even induce remission itself.

There isn't much available information about symbiotics, but they are a logical step that has been taken in pharmacology when we associate two drugs, which will act synergistically.

Faecal matter transplant is a quite old procedure that attempts to correct the dysbiosis directly. This procedure is frequently done in *Clostridium difficile* infections.

It's important to search for new options or explore the ones that produce outcomes in similar pathologies.

Overall, these therapeutic options at least can improve the patients' quality of life.

Keywords: Treatment; Ulcerative Colitis; Microbiota; Microbioma; Probiotics; Prebiotics, Symbiotics; Faecal matter transplant

Índice Geral

ÍNDICE DE FIGURAS	11
ÍNDICE DE TABELAS	11
LISTA DE ACRÔNIMOS	12
INTRODUÇÃO	13
DESENVOLVIMENTO	17
CAPÍTULO 1 – COLITE ULCEROSA	17
1. COLITE ULCEROSA	17
1.1 <i>Epidemiologia</i>	17
1.2 <i>Etiologia</i>	18
1.3 <i>Características Clínicas</i>	19
1.3.1 <i>Fatores Genéticos</i>	21
CAPÍTULO 2 – MICROBIOTA E A SUA RELAÇÃO COM A COLITE ULCEROSA	23
2. MICROBIOTA	23
2.1 <i>ALTERAÇÕES DA MICROBIOTA NA COLITE ULCEROSA</i>	26
CAPÍTULO 3 – PROBIÓTICOS E O SEU PAPEL NA COLITE ULCEROSA	31
3. PROBIÓTICOS	31
3.2 <i>Probióticos e o seu uso na Colite Ulcerosa</i>	42
3.2.1 <i>Estudos na indução da remissão da Colite Ulcerosa</i>	42
3.2.2 <i>Estudos acerca da manutenção após remissão clínica</i>	45
3.3 <i>Efeitos Adversos</i>	50
CAPÍTULO 4 – PREBIÓTICOS E O SEU USO NA COLITE ULCEROSA	53
4. PREBIÓTICOS	53
4.1 <i>Tipos de Prebióticos</i>	54
4.2 <i>Mecanismo de ação</i>	56
4.3 <i>Efeito terapêutico, vantagens e desvantagens</i>	56
4.3.1 <i>Efeitos Adversos</i>	57
4.4 <i>Produção</i>	58
4.5 PREBIÓTICOS E O SEU USO NA COLITE ULCEROSA	58
CAPÍTULO 5 - SIMBIÓTICOS E O SEU PAPEL NA COLITE ULCEROSA	65
5. SIMBIÓTICOS	65
5.1 SIMBIÓTICOS E A SUA INTERVENÇÃO NA COLITE ULCEROSA	65
CAPÍTULO 6 – TRANSPLANTE FECAL NA REMISSÃO DA COLITE ULCEROSA	70
6. TRANSPLANTE FECAL	70
6.1 TRANSPLANTE FECAL NA REMISSÃO DA ULCEROSA	71
6.2 METODOLOGIA	76
6.2.1 <i>Rastreio de dadores</i>	76
6.2.2 <i>Crítérios de exclusão de dadores</i>	77
6.2.3 <i>Via de administração</i>	78
6.2.4 <i>Preparação da amostra</i>	79
6.2.5 <i>Protocolo para o receptor</i>	80
6.3 COMUNIDADE MICROBIANA APÓS TMF	81
6.4 EFEITOS ADVERSOS	81
6.5 SEGURANÇA	83
CONCLUSÃO	85
BIBLIOGRAFIA	87

Índice de Figuras

Figura 1 – Variabilidade da complexidade da microbiota relacionada com o desenvolvimento de DII versus idade e fatores subjacentes.

Figura 2 - Exemplos de mecanismos de ação de probióticos.

Figura 3 - Diferenças nos níveis de expressão de citocinas na mucosa retal, na linha base e passadas 8 semanas.

Figura 4 – Efeitos a nível histológico da administração de IBB de soja, AF-PSE e PSE, em relação ao grupo de controlo.

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Epidemiologia da Colite Ulcerosa.

Tabela 2 - Alteração nas citocinas a nível sérico e da mucosa na CU.

Tabela 3- Classificação de Montreal da CU de acordo com a extensão anatómica.

Tabela 4- Regiões genómicas associadas a CU.

Tabela 5- Alterações no microbioma relacionadas com DII.

Tabela 6- Microrganismos usados como probióticos.

Tabela 7- Número de pacientes que sofreram recidiva ao longo do estudo.

Tabela 8- Fibras que demonstram poder prebiótico.

Tabela 9- Registo da atividade dos compostos na diminuição da expressão dos fatores TNF, IL-1 β , IFN- γ , IL-6, IL-12.

Tabela 10- Rastreio standard a dadores para TMF.

Tabela 11- Efeitos adversos descritos após TMF e consulta subsequente.

Lista de Acrónimos

AA - Aminoácidos

AGCC - Ácidos Gordos de Cadeia Curta

BFM- Bifidobacteria de leite fermentado

CD - Células dendríticas

CU - Colite Ulcerosa

DC - Doença de Crohn

DII - Doença Inflamatória Intestinal

DSS - Dextrano sulfato de sódio

EUA - Estados Unidos da América

GI - Gastrointestinais

IBB - Inibidor Bowman-Birk

ICF - Infecção por *Clostridium difficile*

LAB - Bactérias ácido lácticas

MHC - Complexo major de histocompatibilidade

PEG - Polietilenoglicol

TMF - Transplante de Microbiota Fecal

TURN - Transplantation of feces in Ulcerative Colitis; Returning Nature's Homeostasis

Introdução

Vivemos num mundo cheio de microrganismos, alguns deles benéficos, outros causadores de doenças graves. Surto de doenças como malária, febre amarela, são muito pouco frequentes e nalguns locais estão erradicados, aparecendo novas formas diferentes. A esperança de vida do ser humano vai aumentando com o desenvolvimento dos cuidados médicos. No entanto, cada vez mais se torna visível, o aparecimento de novas patologias que têm apresentações diferentes, muitas dessas tornam-se crónicas e de dia para dia vão roubando qualidade de vida às pessoas que afetam. Quanto mais se torna o mundo estéril e asséptico mais vulneráveis ficamos a outras doenças.

A Colite Ulcerosa (CU) é uma Doença Inflamatória Intestinal (DII) que vem aumentando a sua incidência, desde o início do século XX, nos países com maior desenvolvimento industrial e urbanização constante. Dados literários indicam que a CU possui uma susceptibilidade superior à Doença de Crohn (DC), no que diz respeito aos fatores de risco que advém da urbanização (Fuss & Strober, 2015).

Estatisticamente, mais de dois terços dos doentes, com esta patologia, apresentam pelo menos uma recidiva num período de 10 anos. Daí a necessidade de opções terapêuticas menos agressivas para manutenção durante o período de remissão clínica. A terapêutica convencional habitual utiliza aminosalicilatos, corticosteroides, imunomoduladores e agentes biológicos, consoante o estado da doença. Convencionalmente utiliza-se o seguinte algoritmo (Hanauer, 2008):

- Ligeiro: Aminosalicilatos;
- Moderado/Severo: Corticoesteroides orais, Esteróides IV, Agentes Biológicos, Imunomoduladores;
- Fulminante: Ciclosporina e, em último caso, cirurgia.

Como todas as terapias, esta também se baseia numa escada(ou escala?) terapêutica que é alterada consoante o estadio em que o paciente se encontra e a resposta que este apresenta face à medicação. Os corticosteroides são a segunda opção após falha dos aminosalicilatos, estes são maioritariamente usados para induzir remissão nos doentes após falha terapêutica ou mesmo promover alívio rápido dos sintomas. A aziotropina é utilizada para doentes refratários ou dependentes de corticosteroides. Terapia com

agentes biológicos (Infliximab), está protocolado para uso nos casos moderados/severos que não apresentam resposta aos anteriores. Em última instância, existe a ciclosporina que é a terapêutica de resgate para doentes refratários a esteroides e com CU severa (Hanauer, 2008).

Embora a terapêutica convencional, seja eficaz, na indução da remissão, na manutenção da mesma e decréscimo dos períodos de agudização, em alguns dos casos, os tratamentos não estão ausentes de efeitos secundários, podendo mesmo os pacientes tornarem-se refratários a alguns fármacos de maior potência (Head, Jurenka, & Ascp, 2003).

Quanto maiores forem os períodos de agudização e o número em que estes ocorrem aumenta os riscos de desenvolvimento de outras patologias como: osteoporose, doenças relacionadas com fígado e vesícula biliar, pedras nos rins e cancro do cólon (Head et al., 2003).

Daí surgir a necessidade de procurar alternativas para o tratamento desta patologia, que possa ser igualmente eficaz à terapêutica farmacológica, mas com menos efeitos adversos e sem criar resistências.

O termo microbiota ou microbioma é um termo complexo, engloba todos os microrganismos existentes mais os seus elementos genéticos e respetivas interações com o hospedeiro (Cammarota, Ianaro, Bibbò, & Gasbarrini, 2014; E. M. Quigley, 2011). Esta sinergia, entre hospedeiro e espécies colonizadores, está associada a um estado de homeostasia (Scaldaferri et al., 2013; Vieira, Teixeira, & Martins, 2013; Warinner, Speller, Collins, & Lewis, 2015). Alterações na composição desta podem levar a perda da homeostasia, a um estado de disbiose, induzindo assim patologias (Kostic et al., 2014; Scaldaferri et al., 2013; Xu et al., 2013).

Os probióticos são formulações com microrganismos viáveis, que quando são ingeridos em quantidades adequadas conferem benefício na saúde do hospedeiro. Pertencem na sua maioria aos géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, sendo estas bactérias ácido lácticas (LAB) (Hill et al., 2014; Marteu & Camus, 2011).

Os prebióticos, ao contrário dos probióticos, não são microrganismos viáveis, são ingredientes seletivamente fermentados. Estes ingredientes têm como função promover alterações específicas na composição e/ou atividade da microbiota (Crittenden & Playne, 2009; Patel & DuPont, 2015). Os prebióticos encontram-se distribuídos amplamente, pelas leguminosas, tendo como exemplos: alho, cebolas, trigo, aveia. Mesmo em pequenas quantidades, quase todos os seres humanos ingerem prebióticos na sua alimentação regular (E. M. M- Quigley, 2010; Slavin, 2013).

O uso de simbióticos é uma novidade. O objetivo desta abordagem é através do uso conjunto de probióticos e prebióticos atingir-se uma ação sinérgica. Com isto espera-se potenciar ainda mais o efeito probiótico. Sobre este tópico não existem muitos estudos, sendo no entanto os realizados favoráveis. Os géneros bacterianos alvo, nesta abordagem, são: *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Haskey & Dahl, 2006; Hui, 2006; Patel & DuPont, 2015; E. M. Quigley, 2011; Tuohy et al., 2003).

O Transplante de Microbiota Fecal (TMF) é um ato médico praticado desde a antiguidade. Existem relatos do uso deste na China antiga para tratar estados diarreicos severos. É uma técnica simples, é recolhida uma amostra (fezes) de um dador saudável que posteriormente é transplantada para o recetor (doente) (Camarota et al., 2014; Kelly et al., 2015; Matsuoka et al., 2014). Ao efetuar o transplante, espera-se restaurar a diversidade filogénica e a microbiota, revertendo as alterações que induziram a doença. O primeiro relato desta técnica aplicada à CU ocorreu em 1989, em que o próprio autor foi o sujeito em estudo. A maioria dos estudos realizados acerca desta técnica são no âmbito do tratamento da ICD. Verifica-se, no entanto, uma tendência para um aumento dos estudos realizados em relação à CU, sendo até à data poucos em número (Brandt & Aroniadis, 2013; Kelly et al., 2015; Vrieze et., 2013).

Capítulo 1 – Colite Ulcerosa**1. Colite Ulcerosa**

A Doença Inflamatória Intestinal (DII), é uma doença crónica intestinal atualmente incurável, não infecciosa, mediada pela resposta imunológica do hospedeiro. Existem duas patologias inseridas neste ramo, a DC e a CU (Bunnett & Lingappa, 2006; Friedman & Blumberg S., 2015; Matsuoka, Mizuno, Hayashi, & Hisamatsu, 2014).

A etiologia da CU é ainda desconhecida, mas a corrente de pensamento dominante, especula que a inflamação advém de microbiota alterada ou patogénica, num hospedeiro geneticamente suscetível (Damman et al., 2012).

1.1 Epidemiologia

A incidência averiguou-se ser superior, no norte da Europa, e norte do Continente Americano, sendo que na Ásia ocorre com menor incidência. O desenvolvimento, de quase todos os países, tem progredido no sentido da industrialização, gerando mudanças importantes. Regiões que anteriormente tinham índices mínimos de CU, começam recentemente a aumentar, como é o caso do Sul da Europa e Ásia, que continuam mesmo assim com a menor incidência de entre todos. Na população infantil, esta não é uma patologia com tanta prevalência, sendo esta faixa etária mais afetada pela DC (Friedman & Blumberg S., 2015; Fuss & Strober, 2015).

O seu pico de incidência encontra-se entre os 15-25 anos de idade, sendo a média da idade em que é feito o diagnóstico, mais tardia, aos 37,5 anos. Acresce que a incidência segundo os seguintes autores Fuss & Strober, 2015; Kasper, Fauci, Hauser, Longo, & Jameson, 2015, a nível europeu, situa-se em 10,4/100 000 habitantes em comparação com os EUA (Estados Unidos da América) 8,8/100 000 habitantes.

Segundo Friedman & Blumberg S., 2015, existe uma maior amplitude para os dados, defendendo estes autores que a incidência na Europa tem um intervalo que pode ir de 0.6 até 24.3 doentes por cada 100,000 habitantes, enquanto que nos EUA considera-se que parte dos 0 até 19.2 por cada 1000,000 habitantes. Embora a segunda opinião apresente um intervalo e, não um valor único, é de sublinhar que os primeiros valores mencionados encontram-se inclusos no intervalo definido pelos segundos autores. A nível nacional, os valores têm sofrido um aumento considerável, isto é, em 2003,

encontrava-se em 42 doentes por cada 100 000 habitantes, e em 2007, os dados eram de 71 doentes por cada 100 000 habitantes (Magro et al., 2011).

Os fatores que se são consequências da urbanização incluem: o fumo de tabaco, as dietas ricas em gorduras e açúcares. Prevalência de certos tipos de medicação e ausência de apêndice, aparentam ser uma tendência em países desenvolvidos.

Dos fatores anteriormente mencionados apenas apendicectomia e hábitos tabágicos, foram com reprodutibilidade associados a DII (Fuss & Strober, 2015; Kasper et al., 2015). A epidemiologia desta patologia, está resumida na tabela 1.

Tabela 1- Epidemiologia da Colite Ulcerosa. Adaptado de (Friedman & Blumberg S., 2015; Head et al., 2003).

Epidemiologia da Colite Ulcerosa	
Idade de início	20-40 anos 70-90 anos
Etnia	Judeus > caucasianos não judeus >Hispânicos > Asiáticos
Ratio F/M	0.51-1.58
Hábitos Tabágicos	Poderá atuar como protetor 0.58
Contracetivos Orais	Não aumenta o risco
Apendicectomia	Fator protetor redução do risco em 13-26%
Uso de Antibióticos no 1º ano de vida	Risco aumenta 2,9 x de desenvolver na infância IBD
Amamentação	Fator protetor nos primeiros anos de vida

Uma teoria que explora a importância de fatores ambientais é a Teoria da Higiene, que explora a possibilidade de existência de diminuição da tolerância imunitária. Esta diminuição pensa-se que ocorra, devido a uma diminuição na produção das células-T, por ausência de eventos que levem a estímulos para a produção destas. Isto leva a um número inferior de células-T reguladoras, sem as quais existem uma menor tolerância a microrganismos comensais e uma maior prevalência de estados inflamatórios (Fuss & Strober, 2015).

1.2 Etiologia

A etiologia desta patologia é ainda desconhecida, mas existe evidência que as bactérias são fundamentais para a iniciação e manutenção da doença. Diversas espécies bacterianas são consideradas importantes, como é o caso de: *Bacteroides*, *Streptococcus*, *Shigella*, *Fusobacteria* e *Desulfovibrios*. Vários organismos já se encontram com associação positiva à doença, mas não existe evidência de que a transmissão ocorra por parte de alguma destas bactérias. Alguns estudos indicam um

número elevado de anaeróbios nas fezes de doentes com DII, outros referem que antibióticos cujo alvo são os anaeróbios estritos previnem ulceração em modelos animais.

Nesta patologia verifica-se um aumento da produção de anticorpos contra os microrganismos anaeróbios, mas, no entanto, sem possuir evidência de ser vetor específico.

É sempre provável que as bactérias comensais estejam envolvidas, pois encontram-se em proximidade com os tecidos, podendo a sua interação com o sistema imunitário ser mais extensa que a das espécies luminais (Bernstein, 2014; Macfarlane, Furrie, & Macfarlane, 2004).

1.3 Características Clínicas

Em termos de características clínicas, esta patologia manifesta uma inflamação superficial da mucosa do intestino grosso, ao contrário da DC, na qual a inflamação não é apenas superficial mas sim transmural. A inflamação invariavelmente afeta a mucosa retal e à medida que a doença progride afeta com maior extensão zonas proximais do cólon (Fuss & Strober, 2015).

Sendo esta uma patologia inflamatória é de notar ser normal uma alteração nos níveis de citocinas.

A tabela 2 sistematiza as alterações que existem qualitativamente nestas citocinas na mucosa e a nível sérico (Head et al., 2003).

Tabela 2- Alteração nas citocinas a nível sérico e da mucosa na CU. Adaptado (Head et al., 2003).

Citoquina	Alterações
IL-1	Nível sérico normal, aumentado na mucosa.
IL-6	Nível sérico normal, aumentado na mucosa.
IL-8	Nível sérico indetectável, elevado na mucosa.
IFN-γ	Nível sérico não conhecido, normal na mucosa.
TNF-α	Nível sérico elevado, elevado na mucosa.

A classificação estadios, é feita com base na extensão anatómica da inflamação.

Podendo ser classificada da seguinte forma, segundo o esquematizado na tabela 3 (Satsangi, Silverberg, Vermeire, & Colombel, 2006).

Tabela 3- Classificação de Montreal da CU de acordo com a extensão anatômica. Adaptado de (Satsangi et al., 2006).

Extensão	Anatomia
1º Estadio: Proctite Ulcerosa	Envolvimento limitado ao reto (limite proximal da inflamação é distal à junção retosigmóide).
2º Estadio: CU distal	Envolvimento limitado a uma proporção do cólon e do reto distal à flexura esplénica.
3º Estadio: CU extensa (pancolite)	Envolvimento estende-se proximal à flexura esplénica.

As manifestações clínicas desta patologia dependem da zona e extensão com a qual esta se encontra afetada. Os sintomas maior são diarreia e hematoquezias, com urgência e/ou sangramento retal devido à natureza ulcerativa da patologia. Em associação normalmente ocorre a presença de muco ou pús nas fezes, dores abdominais e perda de peso. Sistemicamente ocorre mal-estar generalizado, febre caquexia, estando estes associados a estados de exacerbação da inflamação. Os sintomas, têm progressão gradual, alternando períodos de remissão com períodos de exacerbação da doença.

Pode ocorrer progressão para um estado, conhecido como colite fulminante, que se caracteriza por sangramento extenso, associado a anemia que muitas vezes para ser corrigida exige transfusões sanguíneas para ser controlada. Em casos de extrema severidade ocorre aumento da temperatura corporal, abdómen duro, dilatação do cólon com ausência de sons intestinais (megacólon tóxico). Nesta fase existe ausência de controlo neurológico da função do cólon, podendo ser uma condição fatal para o doente. Alguns estudos indicam que mais de metade dos doentes no estadio 1º progridem para o 2º estadio. Dos doentes que progridem do 1º estadio para o 2º estadio, em 75% dos casos, observa-se regressão da inflamação. Normalmente a forma mais agressiva apresenta-se nos primeiros 3 anos após o diagnóstico. Para os doentes que nesses primeiros 3 anos, não exista estados de grande severidade, o prognóstico por norma é bom e indicativo de períodos longos de remissão (Fuss & Strober, 2015).

A remissão é definida por diminuição da sintomatologia, diminuição do número de dejeções (≤ 3 por dia). A mucosa retal, neste período, deve encontrar-se ausente de eritema, granulosidade e friabilidade. Daí ser necessário confirmação com exame histológico (Mallon, McKay, Kirk, & Gardiner, 2007).

A ocorrência de displasia ou carcinoma é uma complicação de estados severos, em que a inflamação é elevada e constante e que ao longo do tempo irá levando a alteração da estrutura epitelial. O diagnóstico é feito com base num historial clínico bem

documentado, aliado do observado macroscopicamente através de uma colonoscopia e histologia das biopsias (Fuss & Strober, 2015).

1.3.1 Fatores Genéticos

Existe a possibilidade de fatores genéticos contribuírem para uma predisposição, aumentando assim a probabilidade da doença se manifestar.

Dos diversos estudos realizados, podemos selecionar os mais significativos (Damman et al., 2012; Friedman & Blumberg S., 2015; Fuss & Strober, 2015):

- Sabe-se que 5-10% (ou 5 a 10%?) dos doentes possuem um parente direto que é afetado pela mesma patologia. Famílias em que vários membros são afetados em 75% dos casos, todos encontram-se no mesmo estadio da doença.(Fuss & Strober, 2015);
- Foi divulgado um estudo genético de famílias com mais de um membro afetado, revelando que parentes diretos dos membros afetados possuem uma probabilidade estatística de 10-15% de risco de desenvolver DII. Se ambos os progenitores manifestarem DII, então existe uma probabilidade de 36% de cada filho do casal manifestar também DII;
- Num outro estudo, onde foram usados gêmeos, revela que a concordância entre gêmeos monozigóticos é de 6-18% enquanto que em heterozigóticos é de 0-5%, o que indica que existe baixa influência genética, no máximo cerca de 20%, a componente hereditária envolvida na propensão para o desenvolvimento da doença. Se os dois valores de concordância fossem iguais, isso indicaria que o fator de predisposição seria de carácter ambiental.

Existem locus genéticos identificados alguns são somente específicos de CU e outros encontram-se em comum DC. Os que são específicos para CU encontram-se na tabela 4 (Fuss & Strober, 2015).

Tabela 4- Regiões genômicas associadas a CU. Adaptado de (Fuss & Strober, 2015).

Área Cromossomal	Genes Associados
6p21 (MHC)	Complexo major de histocompatibilidade
1q23	Fc fragmento recetor
12q14	IL-22, IL-26
7q22	LAMB1
20q13	HNF4a (fator nuclear hepatocitário 4)

Capítulo 2 – Microbiota e a sua relação com a Colite Ulcerosa

2. Microbiota

A microbiota engloba na totalidade os microrganismos existentes, fungos e outros eucariotas (*Blastocystis* e *Amoebozoa*), vírus (maioritariamente bacteriófagos), bactérias e seus respectivos elementos genéticos e interações com o ambiente circundante, sendo portanto um termo muito mais completo (Cammarota, Ianaro, Bibbò, & Gasbarrini, 2014; E. M. Quigley, 2011).

Os microrganismos presentes na microbiota coexistem em sinergia com o seu hospedeiro, possuem a capacidade de colonizar a pele, aparelho genito-urinário, respiratório e o gastrointestinal. É de ser reconhecido que os microrganismos que constituem a microbiota se encontram intimamente ligados à manutenção da homeostasia nos respectivos locais que colonizam (Scaldaferri et al., 2013; Vieira, Teixeira, & Martins, 2013; Warinner, Speller, Collins, & Lewis, 2015).

O intestino humano é um ambiente anaeróbio de elevada complexidade, daí ser passível de ser comparado a um “órgão”. Até há poucos anos não era conhecida grande parte da sua extensão como é atualmente. Este “órgão” integra cerca de 150x mais genes que o próprio genoma humano completo (García-García-de-Paredes, Rodríguez-de-Santiago, Aguilera-Castro, Ferre-Aracil, & López-Sanromán, 2014).

Na sua maioria, as relações existentes no universo são de cariz simbiótico, não sendo a microbiota humana uma exceção (Chen, 2014; E. M. Quigley, 2011; Vrieze et al., 2013).

Estima-se que na microbiota exista uma imensidade de microrganismos e que este número seja 10x o número de células de um organismo humano. O grupo bacteriano é o que, sem dúvida, se encontra em maior dimensão na microbiota, podendo representar mais de 1kg do peso corporal de um adulto normal (Cammarota et al., 2014; García-García-de-Paredes et al., 2014; Ho, Chan, & Li, 2015; Scaldaferri et al., 2013; Warinner et al., 2015).

Uns autores indicam que existem 7 filos predominantes: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria* e *Actinobacteria*; estando em maioria estatística, de mais de 90%, os pertencentes à filo *Firmicutes* e *Bacteroides* (Chen, 2014; E. M. Quigley, 2011; Vrieze et al., 2013). Outros autores há que afirmam que no máximo existam 10 filos no trato gastrointestinal, o que se traduz numa variedade de espécies de 500 a 2,000 (Damman, Miller, Surawicz, & Zisman,

2012). Consideram-se, associadas a uma microbiota saudável as filos *Bacteroidetes*, *Bifidobacterium* e *Clostridium* (García-García-de-Paredes et al., 2014).

No duodeno a densidade microbiana aproximada é de 10^3 células por mL, predominando *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Escherichia* e *Corynebacterium*, no jejuno a densidade aumenta para 10^5 células por mL, aumentando ainda mais no cólon ascendente para uma densidade populacional de 10^{12} células por mL, nestas duas últimas, predominam as filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (García-García-de-Paredes et al., 2014; Xu, Xu, Ma, Tang, & Zhang, 2013).

Vários fatores afetam as microbiotas de cada indivíduo, inclusive a escolha calórica. Dietas ricas em proteínas e gorduras animais favorecem o gênero *Bacteroides* e *Ruminococcus*, enquanto que dietas ricas em hidratos de carbono favorecem o gênero *Prevotella* (Damman et al., 2012; Xu et al., 2013).

Arumugam et al., 2011, propõe que os três gêneros predominantes são *Bacteroides*, *Prevotella* e *Ruminococcus*, no entanto estes gêneros estão relacionados com a idade, a geografia e o sexo, embora universalmente todas as microbiotas sejam semelhantes em termos de filo. Um estudo refere que o consumo elevado de hidratos de carbono em conjunto com uma dieta pobre em proteína animal, em sujeitos residentes em Faso, África, levaram estes sujeitos a possuir uma proporção de *Bacteroidetes* grande e uma menor abundância de *Firmicutes*, em comparação com uma população de crianças europeias cuja alimentação é elevada em proteína animal. Explicação para esta diferença será o elevado teor de glicerol presente na dieta, que afeta as comunidades de *Lactobacillus* e *Enterococcus* (Scott, Gratz, Sheridan, Flint, & Duncan, 2013; Xu et al., 2013).

O intestino humano quando nasce encontra-se estéril, apenas adquire as suas primeiras colonizações na altura do parto pela microbiota da mãe. Essa aquisição irá depender da via pela qual o parto se realiza e também da primeira ingestão de alimentos (O'Toole & Claesson, 2010). Esta colonização fica estável perto dos 2 anos de idade sendo praticamente constante durante a vida adulta (E. M. Quigley, 2011; Vrieze et al., 2013). Alterações, na microbiota, podem ser induzidas por alterações drásticas, como na dieta ou uso de antibióticos. A microbiota de uma família é muito semelhante entre os membros que as constituem (Damman et al., 2012).

O ser humano, como hospedeiro, para os microrganismos que dentro dele coabitam, oferece um meio rico em nutrientes para os seus “hóspedes”. Em contrapartida, estes auxiliam com funções metabólicas e genes presentes neles. Funções estas, como

fermentação (maioritariamente no cólon) de substratos não digeríveis ou não acessíveis a enzimas, produção de ácidos gordos de cadeia curta (AGCC), facilitar a absorção de iões, aminoácidos e vitaminas. Os ácidos gordos produzidos podem ser, acetato, butirato e propionato (Fujimori et al., 2009; Kaiko & Stappenbeck, 2014; Scott et al., 2013).

O butirato é considerado a maior fonte de energia para as células epiteliais intestinais. Afetando a proliferação, diferenciação celular, secreção de muco e função barreira (mucosa). Também possui um potencial anti-inflamatório e anti-oxidante. Existem indícios que indicam que os efeitos anteriormente referidos, neste ácido, podem manter a remissão em doentes com CU. Também se encontra associado a um aumento do número de células T-reguladoras(Tregs) (Chen, 2014; Kostic, Xavier, & Gevers, 2014; Patel & DuPont, 2015; Tuohy, Probert, Smejkal, & Gibson, 2003; Vieira et al., 2013; Xu et al., 2013).

Estes microrganismos aumentam também, para além, dos anteriores, a capacidade do hospedeiro para metabolizar xenobióticos e toxinas endógenas, produzindo micronutrientes, vitaminas, renovação celular do epitélio intestinal tendo um papel fulcral no desenvolvimento do sistema imunitário. Existe também uma contribuição para a defesa contra patógenos, na medida em que ao se encontrarem presentes, os patógenos têm de competir com os já residentes para poderem colonizar o ambiente intestinal (Atreya & Neurath, 2010; Damman et al., 2012; Patel & DuPont, 2015).

A definição de microbiota saudável refere-se à capacidade de uma comunidade resistir a alterações que advêm de stress ecológico, ou de retomar o equilíbrio após ter sofrido perturbações. A falta de diversidade ou igualdade na estrutura da comunidade bacteriana, aparenta causar uma diminuição da capacidade de suportar perturbações (Bäckhed et al., 2012).

A disbiose é caracterizada por uma diminuição da diversidade ao nível das espécies existentes (Kelly et al., 2015). Mesmo dentro da variação induzida nas DII, existem ainda subvariações, desta, que dificultam a obtenção de associações (Ruff & Kriegel, 2015). Estas alterações quantitativas ou qualitativas da microbiota humana causam uma perda de homeostasia no organismo, levando à facilidade de desenvolver estados patológicos. Várias patologias já se encontram com ligação cientificamente provada, como a DII, a síndrome do intestino irritável (SII) e outras doenças funcionais do trato gastrointestinal como infeções entéricas e cancro colorectal. Também se encontram presentes em patologias que não são do foro gastrointestinal como obesidade, síndrome

metabólico, autismo e doenças alérgicas (Cammarota et al., 2014; Vieira et al., 2013; Xu et al., 2013).

A característica de maior proeminência na disbiose, apresentada na CU, é um aumento da abundância de *Proteobacteria* (Kump et al., 2013). Doentes com DII, possuem uma diversidade reduzida, em média apresentam menos 25% de genes microbianos em comparação com sujeitos saudáveis utilizados como grupo de controlo (Borody & Khoruts, 2011).

Recentemente verificou-se um aumento da preocupação no que diz respeito à microbiota. Tem vindo a chamar a atenção, que o uso contínuo de antibióticos e alterações na dieta, podem causar danos profundos à microbiota, podendo ser estes fatores que ativamente contribuam para a emergência de doenças e possível aumento da incidência de outras (Khoruts & Weingarden, 2014; Vieira et al., 2013).

2.1 Alterações da microbiota na Colite Ulcerosa

Vários estudos, já publicados, demonstraram que a microbiota intestinal é de extrema importância na imunidade e no metabolismo de obtenção de energia. A desregulação da população comensal, perda de espécies existentes com capacidade protetora cria predisposição para o desenvolvimento de doenças. (Aroniadis & Brandt, 2012)

Existe um padrão visível de alteração na composição do microbioma e perda de funções desempenhadas, por estes microrganismos, que se encontra associado a padrões de DII. Como é possível constatar através da tabela 5, é perceptível que a diminuição de algumas bactérias e o aparecimento de outras se relaciona com alteração de funções metabólicas, diminuição da síntese e aumento do transporte de outras substâncias ou aumento de secreções tóxicas (Kostic et al., 2014; Scaldaferri et al., 2013; Xu et al., 2013).

Tabela 5- Alterações no microbioma relacionadas com DII. Adaptado de(Kostic et al., 2014; Scaldaferri et al., 2013; Xu et al., 2013).

Composição microbiana	<ul style="list-style-type: none"> • Diminuição da diversidade; • Diminuição no género <i>Bacteroides</i> e filo <i>Firmicutes</i>; • Diminuição da família <i>Ruminococcaceae</i>, do género <i>Clostridium</i> (cluster IX e IV), <i>Bifidobacterium</i>, <i>Lactobacillus</i>; • Diminuição <i>F. prausnitzii</i>; • Diminuição das bactérias redutoras de sulfato; • Presença, ou aumento de <i>E. coli</i> invasiva; • Presença de <i>Fusobacterium</i>, aumento da espécie <i>Fusobacterium varium</i>; • Aumento de Gammaproteobacteria; • Aumento de <i>Clostridium difficile</i>; • Aumento de <i>Enterobacteriaceae</i>; • Aumento de <i>Proteobacteria</i>; • Aumento de <i>Actinobacteria</i>.
Função Microbiana	<ul style="list-style-type: none"> • Diminuição de ácidos gordos de cadeia curta e produção de butirato; • Diminuição do metabolismo de propionato e butirato; • Diminuição na biossíntese de aminoácidos(AA); • Aumento da auxotopia; • Aumento no transporte de AA; • Aumento no transporte de sulfatos; • Aumento do stress oxidativo; • Aumento do sistema de secreção tipo II, secreção de toxinas;

Como já foi anteriormente referido a diminuição de certas estirpes leva a uma disbiose e ao desenvolvimento de patologias. Existe também evidência que as microbiotas dos doentes que se encontram em remissão são instáveis. Estudos demonstram que nos primeiros meses de remissão a microbiota mantém-se razoavelmente estável, após 3 meses, nota-se um declínio na sua composição outrora estável, podendo assim contribuir para a reativação da doença (Cammarota et al., 2015).

A microbiota apresenta associação com a severidade da patologia.

Estudos demonstraram que existe um decréscimo exponencial da proporção de *Firmicutes* e um aumento acentuado de Proteobactéria, especialmente, Gammaproteobactéria. *Firmicutes* é encontrada em maiores quantidades em doentes que se encontram no estadio moderado versus menor quantidade populacional encontrada nos que manifestam doença severa. A alteração de organismos anaeróbios estritos para anaeróbios facultativos e o aumento simultâneo de bactérias aeróbias não usuais, evidencia estadios inflamatórios distintos (Walujkar et al., 2014).

A presença do género *Fusobacterium* é um fator alarmante. Este microrganismo é anaeróbio, o principal autóctone da cavidade oral, podendo também subsistir no

ambiente intestinal humano. Espécies deste são encontradas em elevado número na mucosa do cólon e fezes de doentes com CU.

Em modelo animal, verificou-se através da administração de enemas, contendo isolados humanos da variante *Fusobacterium varium* (bacilo anaeróbio não formador de esporos) demonstrou capacidade de induzir erosão da mucosa do cólon nos animais em estudo (Cammarota et al., 2015; Kostic et al., 2014; Scaldaferri et al., 2013). A capacidade invasiva deste agente já se encontra identificada, como contendo correlação positiva para desenvolvimento de DII, podendo assim especular que este poderá estar envolvido na patogênese (Kostic et al., 2014).

Acrescendo ao anterior, DII é o maior fator de risco para o desenvolvimento de cancro colorectal e, por sua vez, isolados de *Fusobacterium* humano demonstrou capacidade de gênese tumoral, em modelo animal, daí podendo pensar-se que estes dois pontos podem encontrar-se interligados (Kostic et al., 2014).

Análise metagenômica de doentes com DII, revelou que 12% das vias metabólicas encontram-se significativamente alteradas em relação a grupos de controlo saudáveis.

Uma tendência metagenômica no microbioma é um aumento de funções de auxotrofia e bactérias residentes, bactérias estas, que têm pouca capacidade intrínseca de produção de nutrientes. Em vez disso, retiram do meio onde estão inseridas, que normalmente é um meio inflamatório e de destruição tecidual. Derivados de taurina, ricos em gordura, conjugados com ácidos biliares, aumentam a disponibilidade de enxofre livre, que causa uma expansão de *Bilophila wadsworthia*, bactéria residente, redutora de enxofre que em ratos geneticamente suscetíveis IL10^{-/-}, possui a capacidade de amplificar a colite.

O metagenoma DII exibe uma propensão de gestão do stress oxidativo, que é característico de um ambiente inflamatório, que na CU é indicado pelo aumento do transporte de glutatona e metabolismo de riboflavina (Cammarota et al., Kostic et al., 2014).

A dieta possui um papel importante. Gorduras e hidratos de carbono não digeríveis mostram capacidade de influenciar a microbiota e a saúde gastrointestinal (Major & Spiller, 2014). Um estudo controlado de larga escala verificou que padrões alimentares a curto prazo poderão não ser a influência com maior proeminência no desenvolvimento da patologia, no entanto a manutenção destes padrões a longo prazo podem alterar o ratio de *Bacteroides*, *Prevotella* e *Firmicutes*. Para colmatar este, foi ainda verificado por outro autor que, o impacto de uma dieta estritamente vegetariana ou vegan, afeta negativamente a variedade microbiana, decrescendo a espécie *Bacteroides* e

Bifidobacterium e *Enterobacteriaceae*, enquanto a carga total microbiana é mantida. É de particular interesse a diminuição no que diz respeito a *Enterobacteriaceae*, pois, é uma das famílias que se encontra consistentemente aumentada em doentes que sofrem de DII. Esta família de bactérias está associada a inflamação intestinal e stress oxidativo. (Kostic et al., 2014)

A idade na qual se manifesta a doença, como já também foi referido, exhibe três fenótipos, consoante a idade, salienta-se que ocorrem todas em fases nas quais a microbiota sofre alterações na sua estabilidade e diversidade.

Pela figura 1, observa-se uma linha a verde a qual diz respeito ao desenvolvimento normal temporal da microbiota com as suas respetivas funções (proteção contra patogénios, estimulação da função imunitária e fornecimento de nutrientes entre outros). Ambas as linhas partem do nascimento, de um ponto onde a complexidade e estabilidade do microbioma ainda é pouco diversificado sendo mais fácil de tender para patologia, por influências como alterações dietéticas, doenças e puberdade.

No adulto, como este já adquiriu uma complexidade superior, a quebra na estabilidade ocorre quase no apogeu a tender para fase estacionária observando-se que decaí com o avançar da idade. Quanto mais tarde ocorre o aparecimento da doença mais difícil é de ocorrer um decréscimo tão profundo, como o que é visível, se a patologia se manifestar em idade precoce (Kostic et al., 2014).

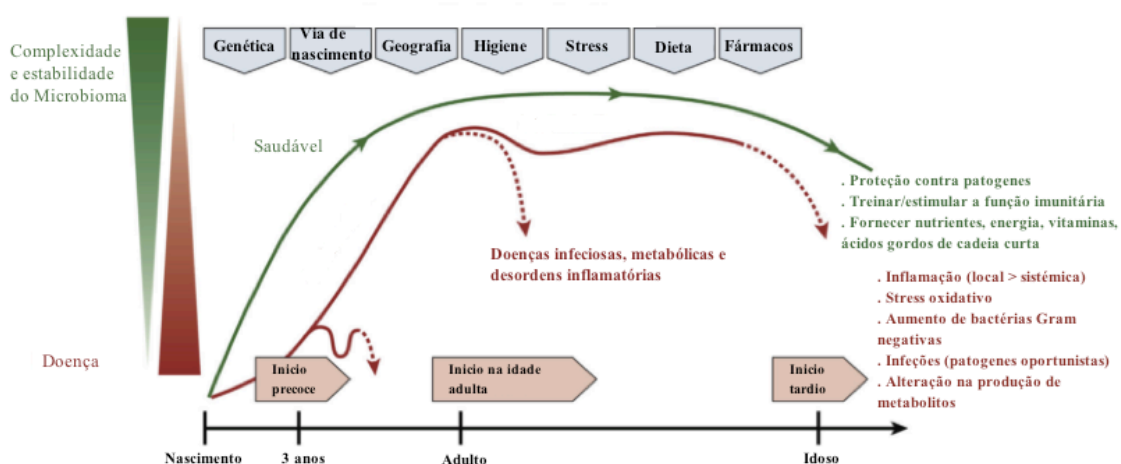


Figura 1- Variabilidade da complexidade da microbiota relacionada com o desenvolvimento de DII versus idade e factores subjacentes. Adaptado de (Kostic et al., 2014)

Em certos géneros bacterianos pensa-se que possuam algum efeito protetor, mas ainda não existem grandes evidências que levem a certezas. Algumas destas espécies podem

exercer algum poder anti-inflamatório local na mucosa, sendo estas *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Faecalibacterium*. A espécie *Faecalibacterium prausnitzii*, encontra-se em pequeno número em doentes com DII, em doentes com DC encontra-se este decréscimo aliado a um aumento de *E. coli* e com risco acrescido de recorrência da patologia, após cirurgia, em relação a CU após agudização se os números desta espécie se elevarem este evento relaciona-se com a manutenção da remissão clínica (Kostic et al., 2014).

Kump *et al*, 2013, especula com base nos estudos acerca de TMF, que pelo facto de haver reversão de alguns dos aspetos da disbiose não levarem a remissão clínica da CU. Nos pacientes inseridos neste estudo, poderá querer dizer que algumas das alterações da microbiota intestinal serão induzidas por inflamação ou pela terapia farmacológica instituída e o aumento do trânsito intestinal.

É também referido, pelo mesmo autor, que podem existir fatores subjacentes à componente inflamatória ou referentes à patogénese da disbiose que ainda não se encontram compreendidos. Isto poderá levar a que para diferentes graus de inflamação e duração, embora alguns doentes consigam aproximar a composição da microbiota à do dador, através de TMF, composição da microbiota em propriedades anti-inflamatórias não é suficiente para induzir remissão nestes.

Um ensaio clínico recente relatou nos seus resultados que, os doentes CU que participaram no estudo em comparação com os dadores saudáveis, possuíam uma diminuição nos membros dos cluters IV, XIVa e XVIII do género *Clostridium* e um aumento na abundância de *Bacteroidetes*, *Bacillus*, *Proteobacteria* e género *Clostridium* clusters IX e XI do (Rossen et al., 2015).

Para se compreender o papel exato da microbiota, suas perturbações e relação com o sucesso terapêutico, foram realizados estudos que conciliem uma avaliação temporal em paralelo com análise da comunidade microbiana existente e respetivas funções são parâmetros necessários para melhor compreensão e avaliação e futura evolução terapêutica (Kostic et Pal., 2014).

Capítulo 3 – Probióticos e o seu papel na Colite Ulcerosa

3. Probióticos

São considerados suplementos alimentares (Garg, Ahuja, Sankar, Kumar, & Moss, 2013; Marteau & Camus, 2011). O seu nome deriva do grego e significa “para a vida” (E. M. M. Quigley, 2010). A sua definição não é consensual, mas todas têm por base definir estes suplementos como microrganismos viáveis, ingeridos por adição a alimentos, geralmente laticínios, embora também possam apresentar-se em forma congelada ou até seca (considerados os dois últimos dúbios) (De Vrese & Schrezenmeir, 2008). Atualmente, a definição veiculada, na Associação Científica Internacional para Probióticos e Prebióticos é a seguinte: “ microrganismo vivo, que quando administrado em quantidades adequadas, confere benefícios à saúde do hospedeiro”(Hill et al., 2014; Marteau & Camus, 2011).

Os estudos efectuados, nas últimas décadas, demonstram a capacidade de moldar as populações e funções destas, com o objetivo de promover saúde ou auxiliar contra *as* (acrescento?) desordens do foro gástrico (Bäckhed et al., 2012).

Estes microrganismos devem obedecer aos seguintes critérios (Haskey & Dahl, 2006; Hojsak & Shamir, 2013) :

- Devem ser capazes de resistir às secreções gástricas, biliares e pancreáticas para chegarem na forma ativa ao intestino grosso e delgado;
- Não serem patogénicas ou tóxicas;
- Manterem-se viáveis durante o seu transporte e armazenamento;
- Exercer efeito benéfico no hospedeiro;
- Ter capacidade de estabilizar a microbiota;
- Ser capaz de aderir ao revestimento celular do epitélio intestinal;
- Produzir substâncias com efeito antimicrobiano contra os patógenos.

A tabela 6 faz referência aos géneros de *Lactobacillus*, *Bifidobacteria* e outros géneros que se consideram, os mais utilizados e disseminados pelo quotidiano (De Vrese & Schrezenmeir, 2008).

Tabela 6- Microrganismos usados como probióticos. Adaptada de (De Vrese & Schrezenmeir, 2008; Williams, 2010).

Microrganismos usados como próbióticos		
<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacteria</i>	<i>Outros</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. longum</i> (BB53 e SP 07/3)	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Propionibacteria</i>
<i>L. (para)casei</i>		<i>E. coli</i> (<i>E. Coli</i> Nissle 1917)
<i>L. rhamnosus</i>		Esporos de <i>Bacillus cereus</i>
<i>L. reuteri</i>		<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. plantarum</i>		

A eficácia, desta abordagem terapêutica, depende em muito das interações específicas com os microrganismos comensais do hospedeiro ou integridade do sistema imunitário das células da mucosa intestinal (De Vrese & Schrezenmeir, 2008).

Os probióticos usados habitualmente são as bactérias produtoras de ácido láctico (LAB), membros usuais da microbiota, não patogênicas, Gram-positivas, catálase-negativa, não formadoras de esporos, anaeróbias facultativos e fermentadores obrigatórios. Podem pertencer a diversos gêneros: *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus* (Dongarrà et al., 2013; Parassol et al., 2005). As LAB, através da produção de ácido láctico, ácido acético e ácido propiônico, levam a uma diminuição no pH intestinal, suprimindo o crescimento de variados patógenos, tentando assim restabelecer o equilíbrio na microbiota (Tuohy et al., 2003; Williams, 2010).

Os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, serão provavelmente os probióticos com maior número de estudos realizados. São considerados bastante seguros, devido ao seu extenso uso na indústria alimentar (Tuohy et al., 2003). Atualmente na Europa *Escherichia coli* (Nissle, 1917), para além, de ser a estirpe melhor caracterizada é um dos poucos probióticos existentes na Europa, que se encontra inserido na classe de medicamento, onde é utilizado como opção de tratamento para prevenção da recorrência de episódios agudos de CU (Guandalini, 2014; Marteau & Camus, 2011; Matthes, Krummenerl, Giensch, Wolff, & Schulze, 2010).

Estão entre os efeitos benéficos destes microrganismos: a supressão de estados diarreicos, alívio da intolerância à lactose, complicações pós-operatórias, atividade antimicrobiana e anticancerígena, redução e prevenção de DII (Bermudez-Brito, Plaza-Díaz, Muñoz-Quezada, Gómez-Llrente, & Gil, 2012).

3.1 Mecanismos de ação

Embora os mecanismos de ação que levam a este efeito benéfico, na sua integralidade, não estejam compreendidos, os mecanismos tomados atualmente como major. A sua ação está potencialmente dependente de um ou mais dos eventos descritos com maior detalhe nos próximos parágrafos. A figura 1 ilustra os eventos que se pensa que sejam os possíveis mecanismos de ação (Ryan, Sibartie, O'Mahony, & Shanahan, 2007).

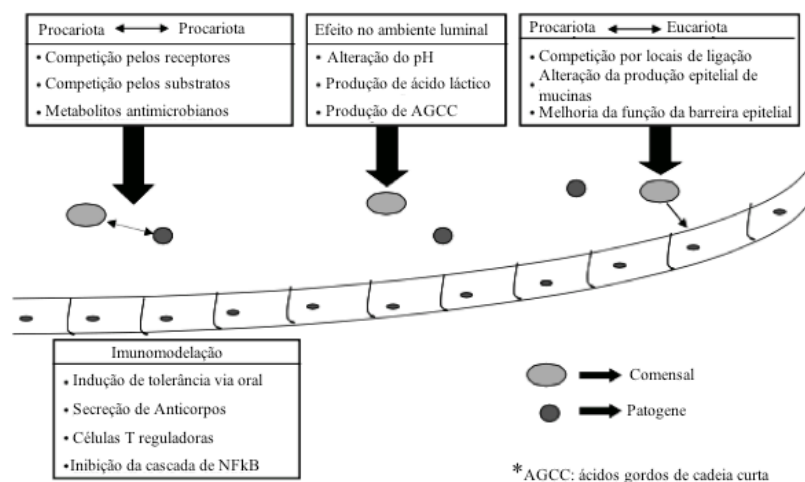


Figura 2 – Exemplos de mecanismos de ação de probióticos Adaptada de (Ryan et al., 2007).

Fortalecimento da barreira epitelial

A barreira epitelial é o principal meio de proteção contra a extravasão bacteriana para o lúmen. Ao ocorrer a sua rutura ocorre a passagem para a submucosa do conteúdo intestinal e bacteriano, originando inflamação. As defesas básicas desta barreira consistem, numa barreira de muco, secreção de péptidos com capacidade antimicrobiana, IgA e o complexo de junção epitelial (Bermudez-Brito et al., 2012).

Estudos indicam que a promoção da expressão dos genes envolvidos na sinalização das junções apertadas (tight junctions), é considerado um mecanismo possível (Bermudez-Brito et al., 2012). A combinação de bactérias com efeito probiótico, VSL#3 (mistura de estirpes bacterianas) tem demonstrado capacidade de estabilizar o citoesqueleto e junções apertadas promovendo a função barreira (Persborn et al., 2013).

Determinadas espécies de *Lactobacillus*, em linhagens celulares, in vitro, revelaram capacidade de modular a expressão de genes envolvidos na codificação de proteínas para junções de aderência, como a E-caderina, β -catenina. Foi observado, também, que a incubação de células intestinais com *Lactobacillus*, influencia a fosforilação de proteínas referentes a junções de aderência e aumento de isoformas da proteína cinase (PKC) como a PKC δ (Hummel, Veltman, Cichon, Sonnenborn, & Schmidt, 2012).

Existe evidência que pode também auxiliar na reparação da barreira epitelial, após esta ter sofrido agressão. A estirpe *Escherichia Coli* Nissle 1917 está descrita que possui atividade que contraria as agressões, mantendo intacta a barreira epitelial, contra *E.coli* enteropatogénica. O efeito reparador observado, *in vitro*, em linhas celulares, é mediado pelo aumento da expressão e redistribuição de proteínas de junção da “zonula occludens” (ZO-2) e PKC, originando desta forma a reconstrução do complexo da junção apertada (Bermudez-Brito et al., 2012).

Há evidência de que, a mistura VLS#3 e *Lactobacillus casei*, possuem a mesma capacidade que a anterior e por mecanismos semelhantes (Parassol et al., 2005). Outras publicações referem, que a mistura VLS#3 exerce um aumento da expressão *in vitro* através da ativação do p38 e regulação de vias de sinalização extracelulares reguladas por cinases (Dai, Zhao, & Jiang, 2012).

Outra abordagem de fortalecimento da barreira e a diminuição dos danos induzidos pelas citocinas inflamatórias, que são características da DII. *Lactobacillus rhamnosus* GG, possui dois péptidos que já foram purificados em laboratório p40 e p75, que levaram à conclusão que estes evitam a apoptose induzida por citocinas, através da ativação da cinase B anti-apoptose. Verificado *in vitro*, em modelo de murina e células epiteliais humanas, a adição de anticorpos específicos para p40 e p75, que cessam a atividade anti-apoptose. Secreção de muco, por parte dos probióticos, pode ser outro mecanismo que auxilie na proteção da barreira epitelial.

Várias espécies de *Lactobacillus* têm a capacidade de aumentar a produção de mucinas por parte das células intestinais humanas. No entanto, este efeito está dependente, da capacidade de adesão destas bactérias à monocamada de células intestinais, o que pode não ser necessariamente verificado *in vivo*. Extrato celular de *Lactobacillus acidophilus*, provou-se ser suficiente para aumentar a expressão de MUC2, MUC3 e MUC5AC em linhas celulares (Bermudez-Brito et al., 2012; Ioannidis, Varnalidis, Paraskevas, & Botsios, 2011; Servin & Coconnier, 2003).

Aumento da adesão à mucosa intestinal

A adesão de bactérias a qualquer que seja a superfície é um pré-requisito essencial para ocorrer a colonização de uma dita área. Não sendo os probióticos, exceção à regra, estes necessitam também de ligação à mucosa, para exercer efeitos antagonistas aos patógenos e atividade modulatória do sistema imunitário.

As bactérias LAB possuem vários pontos de ligação na sua superfície, que estão intimamente relacionados com a sua interação com as células epiteliais e com a produção de muco. As células epiteliais intestinais, secretam uma glicoproteína, denominada de mucina, que é o componente major do muco. O exemplo mais estudado é o do *Lactobacillus reuteri* que produz uma adesina bacteriana denominada de MUB (proteína ligante do muco) cujo alvo é o muco. No género *Lactobacillus*, estas proteínas são maioritariamente secretadas e associadas a uma superfície, ou seja, existem numa forma ancorada à membrana através de porções lipídicas ou inseridas na própria parede celular (Bermudez-Brito et al., 2012; Xu et al., 2013).

As mucinas são caracterizadas pela sua grande dimensão e número abundante de ligações carbono. Existe um grande número de genes humanos que codificam para mucinas, MUC2 e MUC3 são predominantemente ileocólicas.

MUC2 é um polipéptido, constituído por repetições de uma cadeia de 23 aminoácidos, com elevada glicosilação e domínios terminais ricos em cisteína. Alguns autores dizem ser a mucina de secreção predominante no cólon. A expressão genética desta, dá-se maioritariamente nas células caliciformes, do intestino grosso e delgado. MUC3 é constituído por 17 aminoácidos em sequências repetidas – tandem -, o seu domínio terminal carboxil possui homologia com o fator de crescimento epidérmico. Ao contrário do MUC2, a sua expressão não é muito proeminente no cólon, sendo esta expressa tanto nas células caliciformes como nos enterócitos do intestino delgado.

Probióticos, como *L. plantarum* ao induzirem as mucinas MUC2 e MUC3, inibem a adesão de *E. coli* enteropatogénica. Devido ao espessamento das camadas de muco e glicocálice e a ligação dos *Lactobacillus sp.* aos locais de ligação, inibe invasão (Bermudez-Brito et al., 2012; Elson & Weaver, 2010; Mack, Michail, Wei, McDougall, & Hollingsworth, 1999; Ryan et al., 2007).

Existe também um mecanismo de defesa, que através destes microrganismos, leva a um estímulo das células intestinais para a produção de defensas. Estes pequenos péptidos têm atividade contra bactérias, fungos e até vírus, através da estabilização da função da barreira epitelial intestinal, podendo assim ser fundamentais para a prevenção de agudização da patologia. A resposta primária a uma agressão, por parte de agentes patogénicos, é um aumento na produção de proteínas antimicrobianas (AMP's), como a α - e β -defensinas, catelecidinas, lectinas do tipo C e ribonucleases. O objetivo de grande parte destas substâncias é a destabilização da estrutura membranar do patógeno (Atreya & Neurath, 2010; Bermudez-Brito et al., 2012; Matthes et al., 2010).

Exclusão de microrganismos patogénicos por competição

Esta abordagem como o seu título indica é essencialmente a competição de uma determinada estirpe bacteriana, versus outra, em que uma delas devido a vantagens que possa possuir, liga-se aos recetores bacterianos existentes nas células intestinais, ficando a outra estirpe sem recetores aos quais se ligar (Mallon et al., 2007).

Esta competição leva a uma diminuição do crescimento ou “extinção” da estirpe menos apta a ligação. Os mecanismos descritos, para este evento, são os seguintes: alteração do microambiente para que este se torne hostil para sobrevivência da outra estirpe, eliminação dos recetores bacterianos disponíveis para ligação, produção e secreção de substâncias antimicrobianas e metabolitos seletivos e, por último, competição por nutrientes essenciais. Existem propriedades de adesão, que são possíveis devido a interação que existe entre mucinas e proteínas de superfície, o que poderá ser responsável pela inibição da colonização por parte de bactérias patogénicas do trato gastrointestinal.

Lactobacillus e Bifidobactérias, já demonstraram capacidade de inibir um variado número de patógenos, encontram-se nesta lista os gêneros *E. coli*, *Salmonella*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes* e *Rotavirus* (Ryan et al., 2007; Bermudez-Brito et al., 2012).

Quando se fala apenas em exclusão, esta resulta através de mais do que um mecanismo ou propriedade, ou seja, um conjunto como, por exemplo, produção de substâncias antimicrobianas e interações com as células epiteliais da região em causa. A exclusão competitiva, baseia-se em interações, bactéria-bactéria, numa competição direta por locais de ligação às células epiteliais e/ou nutrientes disponíveis no ambiente.

Existem, ainda, vantagens competitivas, uma delas, já mencionada, consiste na transformação de um ambiente normal para um inóspito, promovendo desvantagem para a outra estirpe em competição. Produção de substâncias como ácido láctico e acético, são exemplos de substâncias produzidas para esse fim. Um exemplo prático disto, é dado pelo *Lactobacillus* que reduz o pH do lúmen, para diminuir a capacidade de crescimento de patógenos, através da produção de ácidos gordos de cadeia curta e ácido láctico.

Existe também a hipótese de que a produção de sulfito de hidrogénio e potenciais de oxidação-redução, possíveis em algumas espécies comensais, pode constituir um possível mecanismo viável (Ryan et al., 2007).

Outra forma existente de competição entre bactérias comensais e as patogénicas, é a competição por locais de ligação. Esta competição e exclusão da estirpe que não se liga

só é possível devido a semelhanças existentes, nomeadamente em ligações carbono, partilhadas por alguns *Lactobacillus* e bifidobactérias com bactérias enteropatogénicas. Na sua maioria, os probióticos conseguem inibir a ligação dos patógenos, por impedimento estérico (forças repulsivas), nos recetores dos enterócitos para os patógenos. Esta ligação pode ser uma forma de controlar a colonização do ambiente gastrointestinal ou diminuir as populações. A *Lb. paracasei* evidenciou um efeito inibitório na adesão, consequentemente também na formação de biofilme pela *L. monocytogenes*. Esta hipótese indica que poderá impedir o acesso do patógeno através de hidrância estérica, o que leva, a diminuição da adesão deste às células. (Bendali, Hebraud, & Sadoun, 2014; Bermudez-Brito et al., 2012)

L. rhamnosus é uma estirpe cuja aderência à camada epitelial é elevada, sendo capaz de inibir a internalização da *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) em linhagens celulares. EHEC induz alterações na barreira em diferentes níveis, um deles é a alteração das junções apertadas. Estudos indicam que *L. rhamnosus* estabiliza as junções apertadas, impedindo assim por parte da *E. coli* e a redistribuição de proteína das junções apertadas claudin-1. (Hirano et al., 2003; Johnson-Henry, Donato, Shen-Tu, Gordanpour, & Sherman, 2008)

Produção de substâncias com ação antimicrobiana

Uma habilidade bastante importante dos probióticos, para a defesa do hospedeiro é a secreção de substâncias com efeitos antimicrobianos, que inibem ou diminuem o crescimento microbiano de outros organismos, como por exemplo, *E. coli*, *C. difficile* e *Salmonella*. Os produtos são ácidos orgânicos produzidos. São compostos de baixo peso molecular (<1 000 DA), e bacteriocinas de alto peso molecular (>1 000 DA).

Bactérias ácido lácticas produzem bacteriocinas e ácido láctico. Bacteriocinas estas que são proteínas sintetizadas a nível ribossomal. A produção destas confere às estirpes produtoras vantagem competitiva no ambiente microbiano. Esta substância pode facilitar a colonização e talvez aumentar a prevalência das estirpes produtoras e inibir diretamente o crescimento de patógenos. Existem três classes agrupadas segundo as características bioquímicas e genéticas: lantibioticas, não-lantibioticas, ambas de pequeno tamanho, termoestáveis e em proteínas de grande tamanho termolábeis (Bermudez-Brito et al., 2012; Patel & DuPont, 2015).

L. acidophilus produz lactacina B, *L. plantarum* produz plantaricina e *Lactococcus lactis* produz nisina. O seu espectro de atividade é estreito e está dependente das semelhanças existentes entre o organismo alvo e a bactéria produtora da substância, ou patógenos de

origem alimentar. A maioria inibe outros *Lactobacillus* ou outras bactérias Gram-positivas semelhantes.

Em contraste, outras são contra uma variedade de Gram-positivos ou Gram-negativos e ainda ativos contra leveduras e bolores. O seu modo de atuação é variável, pode dar-se por formação de poros e/ou inibição da síntese de parede celular. (Bermudez-Brito et al., 2012; E. M. Quigley, 2011; Ryan et al., 2007)

Algumas estirpes de *bifidobacterium* produzem uma bacteriocinina. *B. bifidum* NCF1454 produz a bifidocinina que é ativa contra Gram-positivos, contra *Salmonella enterica* ser, *thyphimurium* SL1344 e *E. coli* C1845. Em contraste contra Gram-negativos, o único composto caracterizado, é uma molécula de baixo peso molecular denominada de BIF, produzida por *B. longum* BL1928, que embora não tenha atividade supressora ou causadora de morte direta, esta inibe a ligação da *E. coli* às linhas celulares de células epiteliais humanas.

A proteína antimicrobiana nisina forma complexos com o precursor da parede celular, lípido II, inibindo assim a biossíntese da parede celular, subsequentemente o complexo agregado incorpora péptidos para formar poros na membrana de muitos bacilos formadores de esporos. O ácido láctico é considerado, por muitos autores, o composto major na inibição do crescimento de outros organismos. A sua forma de atuar, baseia-se num ácido orgânico, na forma não dissociada, entra e penetra a célula patogénica. Dentro do citoplasma desta dissocia-se ocorrendo então eventualmente um abaixamento no pH intracelular ou uma acumulação intracelular da forma ionizada, levando ambas as hipóteses à morte do patógeno (Bermudez-Brito et al., 2012; Patel & DuPont, 2015).

Exemplo prático deste evento, ocorre no caso de *H. pylori*, que é inibido o seu crescimento *in vitro* e em modelos humanos de murina por probióticos. Este efeito está associado a produções de ácido láctico elevadas, comprovado pela incubação de *H. pylori* com o ácido. A bactéria torna-se incapaz de se ligar à mucosa gástrica, a sua membrana menos espessa, característica de Gram-negativas, torna-se permeável e suscetível a outras substâncias bactericidas que possam encontrar-se no meio (Bermudez-Brito et al., 2012; Patel & DuPont, 2015; E. M. Quigley, 2011; Ryan et al., 2007).

Probióticos e interações com o sistema imunitário

Imunomodulação é a principal forma que se considera que os probióticos utilizam na tentativa de regular ou normalizar a resposta imunitária. A resposta imunitária do

intestino a microrganismos depende tanto da imunidade inata como da adquirida. A imunidade inata, é um “instinto primário”, é um modo de defesa básico. Existem padrões moleculares (PAMPs) que, são transversalmente comuns a maioria dos patógenos, que são reconhecidos por recetores que reconhecem o padrão (PPR) e é este que distingue se o microrganismo é comensal ou considerado patogénico, usando recetores do tipo toll-like (TLR), que pertencem aos PPR e são atualmente os recetores acerca dos quais se possui maior conhecimento.

Estes recetores permitem reconhecimento imediato, por parte do hospedeiro obtendo a resposta adequada com auxílio das células da componente inata (Camarota et al., 2015; Dongarrà et al., 2013; Vieira et al., 2013).

Atualmente, a família TLR inclui onze proteínas (TLR1-TLR11). A ativação destas proteínas ocorre após ligação do ligando a um conjunto extracelular de repetições ricas em leucinas. Na espécie humana, os TLR1/2/4/5/6/10 encontram-se associados externamente à membrana, respondendo primariamente a PAMPs associados à superfície bacteriana. O TLR3/7/8/9 encontram-se na superfície de endossomas e respondem ao contrário dos anteriores a PAMPs provenientes de ácidos nucleicos de vírus e bactérias. A sinalização mediada por TLR encontra-se também envolvida na maturação de células dendríticas (CD), sendo o TLR-9 dito como essencial para mediar o efeito anti-inflamatório dos probióticos. *Bifidobacterium breve* C50, possui a capacidade de induzir a maturação, aumento da produção de IL-10 e aumento da sobrevivência de CD's através da via dos TLR2, ou seja, torna-se evidente que o efeito imuno-inibitório da bifidobactéria está dependente da existência desta via (Patel & DuPont, 2015; Ryan et al., 2007).

A componente adquirida, é a que atua com maior especificidade, pois é criada para servir apenas um fim. Estas células reconhecem e recordam os antígenos específicos através de recetores específicos das células T e imunoglobulinas. A associação, destas duas defesas, tenta manter a homeostase do hospedeiro e preservar a função da mucosa intestinal. Existem mecanismos, que aprimoram a resposta imunitária, para que esta não sofra picos de resposta inflamatória exacerbada contra a microbiota que deveria ser considerada comensal e por motivo de desregulação é nesse momento considerada como patogénica (Bermudez-Brito et al., 2012).

Tem sido sugerido, por vários autores, que os probióticos possuem a capacidade de mimetizar os microrganismos comensais através da modulação da resposta imunitária,

educando e aprimorando a resposta do hospedeiro (Bermudez-Brito et al., 2012; Patel & DuPont, 2015; Ryan et al., 2007).

Estudos revelam que devido a estes, existe um aumento de produção de anticorpos contra patógenos, especialmente a classe IgA. Existe a possibilidade de certos probióticos, conseguirem modular resposta imunitária específica ou induzir hiporeatividade aos microrganismos comensais (Williams, 2010). A criação de tolerância leva a uma maturação do tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal, assim quando ocorre estímulo por parte de antígenos específicos encontra-se pronto para a produção de IgA adequada. A validação da afirmação anterior, foi atingida através de modelos animais estéreis, os quais mostraram baixa tolerância a antígenos ingeridos e também aos comensais (Bermudez-Brito et al., 2012; Ryan et al., 2007).

Têm sido usados modelos animais, para procurar a existência efetiva de efeitos reguladores no que toca as células T e o balanço entre esse efeito regulador e o processo inflamatório intestinal. Já foi demonstrado, por alguns investigadores, que as células-T é que controlam a imunidade relacionada com a microbiota entérica. Em modelos de murina já foi demonstrado que a resposta a antígenos entérica, encontra-se ligada a um predomínio de T-auxiliares (Th), do género Th2 e Th3 (Bermudez-Brito et al., 2012; Ryan et al., 2007; Vermeire, McGovern, Van Assche, & Rutgeerts, 2010).

A resposta dada por Th2, leva a uma produção de citocinas anti-inflamatórias do tipo IL-4 e IL-10, que promovem a secreção de IgA, enquanto Th3 produz apenas TGF- β . Estas duas respostas são extremamente importantes para o desenvolvimento de tolerância. Este efeito pode estar ligado às melhorias que se observam em doenças que envolvam Th1 como é o caso das doenças inflamatórias intestinais. O mecanismo pelo qual o sistema imunitário distingue patógenos de comensais ainda não está bem definido (Vermeire, McGovern, Van Assche, & Rutgeerts, 2010).

Estas bactérias possuem a capacidade de interagir com as células CD e com monócitos, macrófagos e linfócitos. As CD encontram-se envolvidas na apresentação de antígenos ao sistema imunitário da mucosa, especula-se que seja neste ponto que se dá a diferenciação entre comensal ou patogênica. Bactérias, dadas como comensais, que são apresentadas pelas CD aos nódulos linfáticos mesentéricos, espera-se não obter resposta inflamatória. Estas células podem aprisionar bactérias comensais, por longos períodos, impedindo-as de entrar em contacto com a mucosa. A interação entre CD dá-se através dos PPRs dos microrganismos.

Dados obtidos através de um modelo de murina em ratos, indica que talvez não seja necessário a bactéria viva na sua íntegra, apenas uma fração do seu DNA, que já foi aplicado com sucesso no atenuar de colite, devido ao seu forte efeito imunoestimulador. As sequências imunoestimuladoras ou motivos CpG estão ainda numa fase de estudo (Bermudez-Brito et al., 2012; Ryan et al., 2007; Vermeire, McGovern, Van Assche, & Rutgeerts, 2010).

A transcrição do fator nuclear NFκB é essencial para a resposta imunitária que advém da inflamação gerada pelo patógeno. Está descrito que os probióticos podem exercer, uma certa atividade anti-inflamatória através da inibição desta via de sinalização. Já foi demonstrado que o DNA de certos probióticos pode diminuir a secreção de citocinas pró-inflamatórias, através da atenuação da via de sinalização do NFκB nas células do epitélio intestinal. O fator contra regulador do NFκB é o IκB. Algumas bactérias não patogênicas poderão atenuar a resposta pró-inflamatória, retardando a degradação desta (Hegazy & El-Bedewy, 2010).

Estudos, com *Bacteroides thetaiotaomicron*, comensal não patogênico, atua no NFκB, transcriçionalmente ativo, aumentando a sua exportação nuclear, prevenindo assim resposta inflamatória em linhas celulares de células epiteliais do cólon. Este grupo de bactérias, também, demonstrou ser ativo na via PPAR-γ dependente. Os receptores de proliferação de peroxissomas, são ativados pelos seus ligandos, que originam transcrição de genes anti-inflamatórios e também uma inibição direta do NFκB. Este evento leva a preservação do IκB, ou seja, o κB de ação inibitória, mantendo-se assim a via NFκB inativa (Bermudez-Brito et al., 2012; Elson & Weaver, 2010; Patel & DuPont, 2015; Ryan et al., 2007; Xu et al., 2013).

Modelos de murina sugerem o forte poder modelador da IL-10 para a regulação das células-T. A supressão da resposta inflamatória da mucosa gástrica, através da promoção de uma correta regulação exercida pelas células-T sobre as células efectoras Th1. Existe, ainda, indicação de que a administração de IL-10 possui efeito terapêutico em doenças inflamatórias gastrointestinais, restituindo a tolerância perdida das células-T às bactérias comensais. Outro estudo demonstrou que estirpes específicas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* atenuam, significativamente, a colite em modelos de murina em ratos “knockout”. O efeito atenuante está associado com a diminuta produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α e IL-12), a nível local e sistêmico, enquanto os níveis de TGF-β são mantidos (Bermudez-Brito et al., 2012; Elson &

Weaver, 2010; Patel & DuPont, 2015; Ryan et al., 2007; Vermeire et al., 2010; Xu et al., 2013).

Algumas LAB possuem a capacidade de inibir a liberação de IL-12 como é o caso de *L. reuteri* e *B. bifidum* (Dongarrà et al., 2013). Outras bactérias, como *B. longum*, possuem a capacidade de diminuir a expressão de TNF- α , produção de IL-8, inibição da ativação de NF κ B nas células mononucleares da lâmina própria (Hegazy & El-Bedewy, 2010).

3.2 Probióticos e o seu uso na Colite Ulcerosa

Consideram-se duas abordagens base para o uso de probióticos, a primeira é a indução da remissão da doença e a segunda é a manutenção da remissão. A noção anterior não é uma área cinzenta, pois podem haver outras variantes para além dessa base. Embora alguns estudos não indiquem dados para uma nem outra das opções prévias, contribuem apenas para a melhoria da qualidade de vida, sintomatologia e estado da inflamação. Outros autores falam da indução e manutenção da respetiva remissão.

Intolerância à terapêutica base (farmacológica) é uma das razões por detrás do investimento nesta área em particular (Matthes et al., 2010).

É de elevada importância compartimentalizar onde vai atuar e qual o probiótico e respetiva dose a ser aplicada.

3.2.1 Estudos na indução da remissão da Colite Ulcerosa

Em 2008, a World Gastroenterology Organization (WGO) declarou existência de evidência terapêutica na indução de remissão da CU, com *E. coli* Nisle 1917, nas quantidades de 5×10^{10} de bactérias viáveis em cada uma das duas tomas diárias, demonstrou possuir efeito terapêutico. Em 2011, a mesma entidade, atualizou a *guideline*, alterando esta para tratamento da colite ulcerosa levemente ativa, através da mistura VSL#3, nas quantidades de 4 a 9×10^{11} UFC, duas vezes ao dia. Nesta atualização, referiu que o nível de evidência é de 1b, o que significa que foi um ensaio clínico individual randomizado controlado, cujo intervalo de confiança é estreito (WGO, 2008, 2011).

Os maiores estudos realizados centram-se na utilização da mistura VSL#3.

Esta é uma cultura composta por várias estirpes, para administração oral. Fazem parte as seguintes espécies (Ghouri et al., 2014; Vieira et al., 2013): 4 estirpes de *Lactobacillus*,

Lactobacillus acidophilus, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. bulgaricus*, 3 estirpes de *Bifidobacterium*, *B. breve*, *B. longum*, *B. infantis*, e *Streptococcus thermophilus*.

Em 2004, um autor avaliou 30 doentes, aos quais foi administrado VSL#3 numa só dose diária de 9×10^{14} bactérias (3g/dia), concomitantemente, com balsalazina em dose baixa (2.25 g/dia), por um período de três semanas. Comparou os resultados obtidos da anterior, com uma amostra de 30 doentes, aos quais, só foi administrada uma dose média de balsalazida e com outra amostra de 30 doentes a mesalazina. Obteve uma percentagem de remissão clínica equitativa entre balsalazida com VSL#3 e balsalazida em dose considerada média. Estatisticamente a balsalazida com VSL#3 (22 doentes) obteve uma percentagem de remissão clínica superior comparada com a mesalazina (16 doentes).

Observou-se que VSL#3 aparenta ser capaz de aumentar as concentrações de IL-10 (potente anti-inflamatório) nos tecidos e diminuir também a nível dos tecidos citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1, IFN- γ) e, também, a atividade de metaloproteinases da matriz. A conclusão deste autor foi de que em baixas concentrações a balsalazina não possui tantos efeitos adversos e em associação com VSL#3 consegue obter-se uma boa percentagem de remissão com alguma rapidez, em 4 dias, enquanto que com outros doentes demorou um pouco mais de tempo (máximo 13 dias) (Tursi et al., 2004).

Matthes *et al*, 2010, estudou-se a hipótese do efeito probiótico da *Escherichia coli* Nissle 1917. O modelo de estudo foi duplamente-cego, randomizado, com grupo placebo, multicêntrico e de fase 2 (para descoberta da dose ideal). A amostra abrangeu 90 doentes com CU moderada distal. Os 90 doentes foram divididos em três grupos, aos quais, foi administrado um enema contendo o probiótico (*Escherichia coli* Nissle 1917), numa dose de 10^8 microrganismos viáveis por mL, a cada grupo correspondia uma dosagem 40 mL, 20 mL, 10 mL ou placebo, o doentes a placebo foram inseridos dentro dos 3 grupos de probiótico. O enema era administrado, todas as noites, para permanecer o maior tempo possível no reto. Por questões éticas, após 2 semanas se não ocorresse melhoria os doentes eram classificados como “não respondedores” e o seu tratamento descontinuado. O autor concluiu que a taxa de remissão era dose dependente, 40mL (52.9%), 20 mL (44.4%), 10 mL (27.3%) e grupo placebo (18.2%). Obtendo uma remissão de 57 em 90 indivíduos no final do estudo.

O tempo que decorreu, até os sujeitos entrarem em remissão, segue a mesma tendência que a taxa de remissão. Outro dado positivo, foi uma melhoria no geral em termos de remissão e melhoria histológica que novamente foi superior no grupo ao qual foi

administrado os 40 mL (47.6%), seguido do grupo, ao qual foi administrado 10 mL (45.5%). Em todos houve diminuição da inflamação a nível da mucosa em comparação com a linha de base, da atividade da doença e sintomatologia no geral. Da avaliação efetuada pelo autor, o objetivo principal foi atingido, através da diminuição da sintomatologia clínica, coincidindo com a avaliação pessoal feita pelos sujeitos em estudo. Apoiado em estudos anteriores e tendo prosseguido para a fase II, o autor afirmou que se tratava de uma boa opção para tratamento, em particular no que concerne o enema de 40mL.

Em contraste, com os estudos anteriores Hegazy & El-Bedewy, 2010, publicou um estudo cujo objetivo era apenas provar o efeito terapêutico e verificar qual o efeito nos mediadores inflamatórios.

Participaram 30 pacientes com CU no estadio ligeiro a moderado. O estudo decorreu durante 8 semanas, um período relativamente curto, comparativamente com outros estudos. Foram randomizados em dois grupos: um primeiro ao qual foi, apenas, administrado sulfasalazina numa dose 2400 mg/dia; o segundo grupo recebeu em concomitância com a dose anterior de sulfasalazina com probiótico numa dose de 10 bilhões de UFC. O probiótico utilizado foi uma combinação de *Lactobacillus delbruekii* e *Lactobacillus fermentum*.

O autor verificou no final das 8 semanas que o segundo grupo (sulfasalazina + probiótico) apresentava inflamação com menor extensão, houve nestes prevenção de danos na mucosa e alívio da colite. Os níveis de IL-6 e TNF- α mostraram estar inferiores aos encontrados na linha de base no início do estudo. Neste grupo houve diminuição da atividade mieloperoxidase. Simeoli et al., 2015 refere que o recrutamento de neutrófilos encontra-se intimamente ligado à concentração da mieloperoxidase.

As leveduras também foram alvo de estudo para o tratamento da CU. Em 2003 e 2010, o probiótico *saccharomyces boulardii* demonstrou eficácia no campo de indução da remissão em doentes no estadio ligeiro e moderado, com intolerância a esteroides e também na manutenção da remissão nos doentes com CU distal moderada intolerantes a salicilatos. No entanto, estes dois estudos citados por Cammarota et al., 2015, não foram estudos randomizados e não permitem tirar conclusões devido a ausência de um modelo de estudo que permita concluir acerca da veracidade da atividade desta levedura.

Ghouri et al., 2014, compara os estudos de Sood et al., 2009 e o de Tursi et al., 2004.

Na sua revisão sistemática Ghouri et al., comparou os resultados dos dois autores, ambos utilizaram uma dose de 3600 bilhões de bactérias/dia. A amostra foi de

respetivamente 147 e 144, com uma colite ligeira a moderada e administração concomitante de aminossalicilatos ou tiopurinas. Ambos observaram um decréscimo da atividade da doença igual ou superior a 50%.

Às 12 semanas, Stood *et al.*, 2009, reportou no grupo a VSL#3 uma percentagem de remissão de 42.9% em comparação com os 15.7% no grupo a placebo. Comparativamente ao anterior, Tursi *et al.*, obteve remissão de 47.7% no grupo tratado versus 32.4% no grupo a placebo. Neste último, os resultados não foram considerados estatisticamente relevantes, devido á elevada resposta obtida no grupo placebo.

Foi verificado, como no estudo anterior de Tursi *et al.*, em 2004, que houve um aumento na produção de IL-10.

VSL#3 tem efeitos anti-inflamatórios semelhantes a *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Demonstrado em modelos experimentais de colite, o efeito anti-inflamatório pode-se hipoteticamente dever unicamente ao DNA bacteriano (E. M. Quigley, 2011).

Dois estudos com o mesmo modelo e a mesma quantidade administrada de VSL#3 apresentaram resultados um pouco distintos. Ambos utilizaram 3.6×10^{12} CFU de VSL#3 versus o uso de placebo, no grupo de controlo. No primeiro estudo, a resposta clinica em termos de remissão não foi considerada estatisticamente relevante. Tendo sido perceptível, apenas, no grupo em que estava a ser administrado VSL#3.

A resposta clínica foi significativa, embora não tenha entrado em remissão nenhum dos indivíduos. No segundo grupo, obteve-se resultados favoráveis em relação à remissão, 42.9% no grupo ao qual era administrado VSL#3 versus 15.9% no grupo de controlo com placebo. Foi, também, observada uma melhoria endoscópica, estatisticamente relevante, de respetivamente 32% no grupo a VSL#3 e de 14.7% no grupo de controlo (Patel & DuPont, 2015).

3.2.2 Estudos acerca da manutenção após remissão clinica

Ishikawa *et al.*, 2003, publicou um estudo randomizado com grupo de controlo. Foi dividido em dois grupos um grupode estudo ao qual foi administrado bifidobacteria de leite fermentado (BFM) (11 doentes), concomitantemente com a sua terapêutica farmacológica habitual, e o outro grupo a placebo (10 doentes). BFM é um produto, de origem japonesa, que contém estirpes de bifidobactérias vivas, que são as seguintes: *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum* e *Lactobacillus acidophilus* YIT 0168, em doses de pelo menos 10 biliões por 100 mL.

O estudo decorreu durante um ano, sendo a dose diária administrada de 100 mL.

No decurso do estudo, apenas 3 sujeitos (27%) sofreram exacerbação dos sintomas versus 9 (90%) no grupo placebo. No grupo de estudo, o número de exacerbações foi de zero a duas, enquanto que no grupo de controlo houve três casos de duas ou mais exacerbações.

Após efetuarem colonoscopias, não houve diferenças entre os grupos. Em termos da análise fecal, não foi encontrada qualquer diferença entre grupos nas contagens de *Bacteroidaceae* ou bifidobactérias. No final do ano de estudo, foi encontrado, no grupo de estudo, estirpes de *Bif. Breve*. em 9 dos 10 sujeitos e em todos *Bif. bifidum*.

Observou-se um decréscimo nas existências de butirato a nível fecal, o que levantou questões acerca da dinâmica e importância dos ácidos gordos de cadeia curta, no tratamento da CU. Adicionalmente existiu uma melhoria na qualidade de vida dos doentes, com uma diminuição das exacerbações, podendo concluir-se que pode ser uma boa ajuda na manutenção da remissão.

Num outro estudo de 2004, cujo objetivo não era a avaliação da atividade em si, mas sim, se haveria valor terapêutico equitativo e a prevenção de recidivas entre mesalazina e *E. coli* Nisle 1917. O estudo foi duplamente cego, teve a participação de 327 doentes. No grupo ao qual foi administrado o probiótico ficaram 162 sujeitos, no grupo a mesalazina foram 165 sujeitos. Estes recebiam 200mg diariamente de probiótico ou, então 500mg três vezes dia de mesalazina, por um período de 12 meses. Em termos de resultados nos sujeitos aos quais foi administrado probiótico 40 de 110 (36.4%) tiveram recidivas, enquanto que nos sujeitos a mesalazina foram 38 de 112 (33.9%), estes valores demonstram uma equivalência terapêutica entre os dois (Kruis et al., 2004).

Zocco *et al*, 2006, avaliou a eficácia do probiótico *Lactobacillus* GG, usando grupos para obter uma comparação de maior amplitude. Este autor usou uma amostra de 187 doentes randomizados em 3 grupos, no primeiro grupo (65 doentes) foi administrado o probiótico numa dose de 18×10^9 bactérias viáveis por dia, no segundo (60 doentes) que recebeu mesalazina numa dose de 2400 mg/dia e no terceiro (62 doentes), aos quais, foi administrado os dois anteriores em conjunto, durante um período de 12 meses.

Nos primeiros 6 meses do estudo, 6 doentes do grupo a probiótico, 8 do grupo a mesalazina e 4 do grupo da terapêutica combinada, apresentaram sinais de recidiva. É pertinente referir as percentagens de doentes que mantiveram remissão aos 6 e aos 12 meses, pois a tendência para os três grupos foi um decréscimo percentual. Aos 6 e 12 meses, as percentagens foram, respetivamente, as seguintes; para o grupo a probiótico

91% que decresceu para 85%, no grupo a mesalazina passou, de 87% para 80%, no ultimo grupo decaiu de 94% para 84%. No entanto, tanto a percentagem de recidiva como as avaliações endoscópicas foram consideradas como não tendo diferença estatística entre os diferentes esquemas terapêuticos.

A conclusão que o autor extraiu deste estudo foi de que existe eficácia equiparável entre elas, podendo qualquer uma ser válida e atrasar o ponto de recidiva do sujeito (Zocco et al., 2006).

Em 2007, a entidade Cochrane lançou a sua primeira revisão sistemática acerca deste tema. Mallon *et al*, 2007, após analisar 9 ensaios, concluiu que os probióticos podem oferecer eficácia na manutenção da remissão (não na indução da dita remissão), em doentes em estadio ligeiro a moderado. No entanto, no caso do estadio moderado a severo, a eficácia limitada era o previsto. Esta revisão diz respeito à comparação de eficácia na manutenção da remissão em doentes com UC , entre probióticos e o fármaco mesalazina.

Em pediatria, o único estudo com VSL#3, apresentou bons resultados. O ensaio tinha como objetivo verificar na população infantil se o probiótico em estudo possuía a capacidade de manter a remissão atingida farmacologicamente.

Foram alvo deste ensaio 29 crianças, com doença ativa ligeira a moderada, que se encontravam sob terapêutica previamente instituída, prednisolona e mesalazina, no decorrer do estudo permaneceram com esta, passando a ser introduzida a administração de placebo ou então VSL#3, para indução de remissão. Os investigadores concluíram que a taxa de remissão atingida e a de recidiva eram bastante favoráveis, tal como, a melhoria endoscópica e histológica, versus o grupo a placebo (Guandalini, 2014).

Wildt, Nordgaard, Hansen, Brockmann, & Rumessen, 2011, investigou o efeito clinico do tratamento com *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12. No modelo de estudo duplamente cego, com grupo controlo placebo, num total de 32 sujeitos em estudo (Wildt, Nordgaard, Hansen, Brockmann, & Rumessen, 2011).

Cada cápsula do probiótico continha no total 2.5×10^{10} CFU das bactérias em conjunto, por um período de 52 semanas.

Neste estudo, o autor definiu dois objetivos, no primeiro pretendia verificar ou não se existia manutenção da remissão: Apenas 5 sujeitos (25%) do grupo de estudo mantiveram remissão, após 1 ano de tratamento, no grupo placebo apenas 1 sujeito manteve a remissão (8%). O segundo objetivo era a avaliação do tempo até ocorrer

recidiva no grupo ao qual era administrado o probiótico foi de 125.5 dias versus o grupo placebo cuja média foi de 104 dias.

Os resultados deste estudo não foram considerados estatisticamente relevantes (devido ao reduzido número de sujeitos que ingressaram no estudo. A diferença temporal obtida no segundo objetivo do autor pode não ser muito significativa devido à ausência de administração concomitante de mesalazina como ocorre na maioria dos estudos que seguem a vertente de manutenção da remissão clínica.

Em pediatria, um estudo elaborado por Oliva *et al*, 2012, visou avaliar a eficácia do probiótico *Lactobacillus (L) reuteri* ATCC 55730 nas citocinas inflamatórias, usando a via retal. A amostra abrangeu 40 sujeitos, com colite ligeira a moderada distal, randomizados, em grupo de controlo ou em grupo de estudo, aos quais, é administrado probiótico, concomitantemente com a terapêutica farmacológica mesalazina. O enema, 10^{10} CFU de *L. reuteri* ATCC 55730 por um período de 8 semanas.

No decorrer do estudo, nas primeiras semanas, foram excluídos 9 devido a baixa adesão à administração do enema e outros devido ao aparecimento de infeções, o que pode ser considerado natural em população pediátrica.

Na linha de base, não havia diferença nos níveis de citocinas entre os grupos. Na avaliação, após o fim do estudo, no grupo ao qual foi administrado probiótico, observaram-se níveis aumentados de expressão na mucosa de IL-10 (de efeito anti-inflamatório conhecido) e um decréscimo de IL-1 β , TNF α e IL-8, que é visível na figura 3.

Este estudo, por ter um grupo de controlo permitiu a conclusão por parte dos autores que tem eficácia clínica documentada. A administração do enema com esta estirpe específica em simultâneo com a terapêutica farmacológica ou evidenciaram um decréscimo marcado do dano a nível da mucosa avaliado a partir de endoscopia e histologia, porquanto verificou-se uma diminuição acentuada?) da expressão de citocinas inflamatórias. O critério de escolha, para os sujeitos em estudo, era todos terem colite distal, pois, a via de administração alvo era a retal.

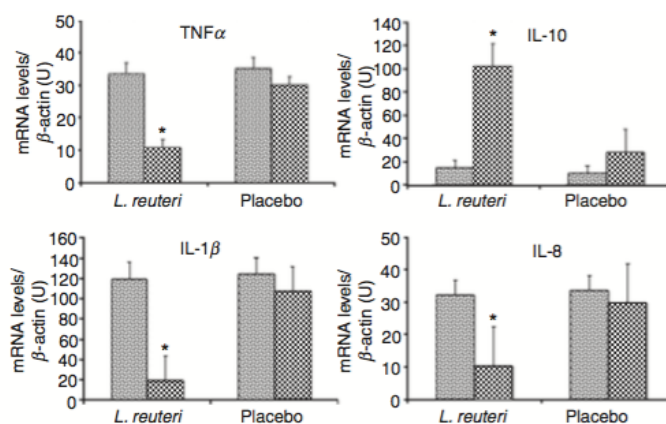


Figura 3 – Diferenças nos níveis de expressão de citocinas na mucosa retal, na linha base e passadas 8 semanas. Adaptado de (Oliva et al., 2012).

O estudo realizado por Yoshimatsu et al., 2015 teve como objetivo verificar a eficácia de probióticos na prevenção da recidiva em doentes com a patologia inativa.

Foi utilizado “Bio-three tablets”, comprimidos com três componentes biologicamente ativos: 2mg de lactomin (*Streptococcus faecalis* T-110), 10mg de *Clostridium butyricum* TO-A e 10 mg de *Bacillus mesentericus* TO-A. É de referir que nenhuma destas estirpes foi previamente utilizada em nenhum dos estudos anteriormente descritos. Esta preparação possui eficácia cientificamente comprovada na resolução de vários sintomas causados por disbiose, apresentando melhorias em desordens relacionadas com o peristaltismo intestinal. O tratamento foi instituído a 60 doentes externos, Randomizados para receber 9 comprimidos de “bio-three”, por dia, ou 9 comprimidos placebo. O estudo durou 12 meses.

Durante todo o período no qual decorreu o estudo, a toma de medicação foi interdita aos respetivos sujeitos, cujo efeito fosse similar ao que pretendia ser avaliado. Os autores avaliaram o número de doentes a sofrerem de recidivas durante o processo. Verificaram, logo, uma ligeira diferença no primeiro trimestre entre os dois grupos, visível na tabela 7. Comparativamente com o grupo ao qual foi administrado o probiótico, o grupo placebo obteve um número superior de sujeitos que sofreram recidivas.

Tabela 7 – Número de pacientes que sofreram recidivas ao longo do estudo. Adaptado de (Yoshimatsu et al., 2015).

	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
“Bio-three”	0	2	5	7
Placebo	4	6	8	10

Ao fim dos 12 meses, a percentagem de remissão para o grupo em estudo era de 69.5% versus os 56.6% apresentados pelo grupo placebo.

Derivado de estudos anteriores realizados por este autor, surgiu a noção de divisão dos sujeitos em grupos I, II e III consoante a análise das amostras fecais. O grupo que apresentou melhor resposta ao probiótico foi o II, que apresentava um ratio superior de OTU124 (Bifidobactérias).

Estudos posteriores revelaram que a flora considerada ideal pertencia ao grupo II, o que permitiu concluir que este grupo possuía a composição mais próxima da saudável. E será o grupo que possivelmente menos irá usufruir dos efeitos de probióticos. Estes são provavelmente mais eficazes em microbiotas com maior desvio em relação à normalidade. As ilações, deste autor, são suportadas pelas suas pesquisas anteriores.

Neste estudo, após indução de remissão de 70%, os sujeitos possuíam uma microbiota pertencente ao grupo II, resultado espetável dentro da população em remissão. No início do estudo, os 7 sujeitos pertenciam ao grupo I (grupo mais afastado do grupo II em composição), destes, apenas nos 3 que pertenciam ao grupo probiótico, mantiveram-se em remissão versus apenas 1 do grupo placebo.

Este aspeto indica novamente a ideia de menor eficiência no grupo II, em relação ao que ocorre nos outros. O rácio butirato/acetato, apresentava-se superior no grupo I. Nos sujeitos em remissão, este rácio encontrava-se elevado nos 6 meses prévios. Níveis de butirato baixos foram relacionados, pelo autor, a um estado inflamatório. O que permitiu concluir que quanto maior a concentração fecal de butirato menor será esta no sistema, maior será a probabilidade de haver recidivas nos sujeitos.

A importância deste artigo contribuiu para a noção da existência de grupos com base na análise fecal. Sendo esta feita previamente à administração de probióticos pode prever de certa forma a eficácia do probiótico e melhor direccionar estudos futuros.

3.3 Efeitos Adversos

Uma parcela de elevada importância de qualquer estudo acerca da eficácia terapêutica é a noção da existência ou não de efeitos adversos que possam comprometer o seu uso (avaliação risco/benefício). Os efeitos adversos mais comuns são os do trato gastrointestinal causados pela estirpe administrada (Hojsak & Shamir, 2013).

Kruis *et al.*, 2004, reportou a descontinuação da medicação devido a efeitos adversos, que incluiu recidiva, em 22 dos sujeitos totais, equitativamente distribuídos por dois grupos. Os efeitos adversos na sua maioria foram gastrointestinais, fezes

sanguinolentas, náusea, diarreia com secreções de natureza mucosa e dor abdominal, sendo esta última com menor incidência no grupo a probiótico. De notar que na sua maioria, os efeitos adversos observados coincidem com a sintomatologia observada na doença no seu estado ativo.

Wildt *et al.*, 2011, obteve um número maior de efeitos adversos nos sujeitos aos quais foi administrado a mistura de probióticos em 25 sujeitos em comparação com 12 do grupo placebo. Estes efeitos reportados foram: flatulência, inchaço e dores abdominais, alterações da consistência fecal, dores músculo-esqueléticas (apenas no grupo a probiótico), cefaleias, tonturas, infecções (gastroenterites, influenza, cistite e pneumonia) e outros como incontinência e xerofthalmia.

No estudo realizado por Ishikawa *et al.*, 2003, foi relatado no decorrer do segundo mês de suplementação, num único sujeito, uma doença do género de coriza, acompanhada de dores abdominais sem diarreia ou vômitos. Neste indivíduo, a suplementação foi suprimida durante duas semanas, tempo que esteve sujeito à terapêutica para a doença que desenvolveu. Este evento não foi considerado como tendo ligação à administração de BFM pois não foi reportado em mais nenhum dos sujeitos em estudo.

Matthes *et al.*, 2010, reporta que 47 de 88 sujeitos sofreram pelo menos um evento adverso no decorrer do estudo. Foi no entanto semelhante em todos os grupos, 43.5%, 65.2%, 54.5%, 50.0%, respetivamente 40 mL, 20 mL, 10 mL e o grupo placebo. Dos 88 sujeitos, 13.6% (destes) desenvolveram doenças concomitantes. Na sua maioria, os efeitos adversos foram: flatulência e sintomas gastrointestinais.

Até à data, os autores que efetuaram revisões sistemáticas afirmam que, apenas a mistura VSL#3, *E. coli* Nissle, apresenta uma grande evidência de atividade. Quanto a outras estirpes ainda é necessário mais investigação (Floch, 2014; Marteau & Camus, 2011; Sanders *et al.*, 2013).

Capítulo 4 – Prébióticos e o seu uso na Colite Ulcerosa

4. Prebióticos

Foram definidos em 2010, pela Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos como: “Ingredientes seletivamente fermentados que resultam em mudanças específicas, na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal, conferindo benefícios à saúde do hospedeiro” (Bäckhed et al., 2012; Gibson et al., 2010).

A maioria dos compostos identificados, nesta categoria, são hidratos de carbono, dentro dos quais existe uma ampla variedade de compostos. Essa diversidade deve-se aos diferentes arranjos moleculares possíveis. No entanto, todos partilham traços de atividade fisiológica, que conferem esses benefícios (Crittenden & Playne, 2009; Guandalini, 2014; Patel & DuPont, 2015). Tendo estes os seguintes traços (Crittenden & Playne, 2009):

- Serem parciais ou não digeríveis;
- Não absorvíveis no intestino delgado;
- Baixa fermentação, por parte das bactérias residentes da cavidade oral e pelas potencialmente patogénicas inseridas no trato intestinal;
- Boa fermentação, por parte das bactérias do alegado benefício, na saúde intestinal.

Neste grupo, encontram-se fruto-oligossacáridos (FOS), polifrutanos (inulina), galacto-oligossacáridos(GOS) e β -glucanos sendo estes os que possuem evidência científica de atividade (Crittenden & Playne, 2009; Guandalini, 2014). A fermentação sofrida no intestino grosso através de microrganismos específicos, gera AGCC e lactato, o que possibilita benefício fisiológico para o hospedeiro, por estímulo seletivo e atividade de espécies com interesse de entre as comensais e não comensais, em especial, os géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. É de notar que é mais fácil a observação de alterações, no segundo género, pois, este reside em maiores números no cólon que o *Lactobaccillus* e, também, apresenta maior tropismo para oligosacárdidos (E. M. Quigley, 2011; Scaldaferri et al., 2013).

Os efeitos benéficos destes são: melhoria na função da barreira mucosa, melhoria na imunidade do hospedeiro, redução de subpopulações bacterianas que podem ser patogénicas e aumento da produção e AGCC (Slavin, 2013).

Estes podem ser manipulados para obterem um efeito específico. Exemplo prático é *a* (acrescento?) administração de transgalacto-oligosacarídeos para aumentar o número de bifidobactérias úteis (E. M. Quigley, 2011).

4.1 Tipos de Prebióticos

Na tabela 8, encontram-se alguns exemplos de componentes e respetivo efeito prebiótico associado (Crittenden & Playne, 2009; Slavin, 2013).

Tabela 8- Fibras que demonstram poder prebiótico. Adaptado de (Crittenden & Playne, 2009; Slavin, 2013).

Prebióticos	Efeito Prebiótico
Dextrina de Trigo	<ul style="list-style-type: none">• Aumento do género bacteroides• Diminuição de <i>Clostridium perfringens</i>
Inulina	<ul style="list-style-type: none">• Efeito Bifidogénico
Galacto-oligosacáridos	<ul style="list-style-type: none">• Prebiótico com Bifidogénico,
Goma de Acadia	<ul style="list-style-type: none">• Efeito Bifidogénico
Polidextrose	<ul style="list-style-type: none">• Efeito Bifidogénico
Psyllium	<ul style="list-style-type: none">• Potencial Prebiótico
Cereais Integrais	<ul style="list-style-type: none">• Potencial Prebiótico
Lactulose	<ul style="list-style-type: none">• Efeito Prebiótico
Fructanos (fruto-oligosacáridos e inulina)	<ul style="list-style-type: none">• Efeito Prebiótico com efeito Bifidogénico
Banana	<ul style="list-style-type: none">• Efeito na microbiota fecal

O efeito prebiótico classificado, como potencial, significa que ao contrário do que é afirmado possui efeito bifidogénico, os primeiros não revelam evidência científica suficiente permanecendo como apenas designados como potenciais (Slavin, 2013).

Os prebióticos existem naturalmente inseridos na natureza como, por exemplo, no alho-porro, espargos, alcachofra de Jerusalém, alho, cebolas, trigo, aveia e nos grãos de soja (E. M. M. Quigley, 2010; Slavin, 2013). Estes podem estar adicionados a alimentos como iogurtes, cereais, pão, bolachas, gelados, bebidas e suplementos. Os prebióticos podem encontrar-se inseridos em alimentos denominados de alimentos funcionais (alimentos que possuem efeitos benéficos para a saúde, além do valor nutritivo inerente à sua composição). Também podem ser considerados como uma subcategoria de ingredientes presentes em alimentos funcionais (Brownawell et al., 2012).

Embora todos os prebióticos sejam considerados fibras, nem todas as fibras podem ser considerados como prebióticos. Para que haja a aplicação desta nomenclatura, cientificamente tem de ser provados e satisfeitos os seguintes requisitos (Gibson et al., 2010; Slavin, 2013):

- Resistência ao ácido gástrico, hidrólise enzimática realizada pelas células dos mamíferos e serem absorvidas no trato gastrointestinal superior;
- Ser fermentada pela microflora intestinal;
- Estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de bactérias com associação a manutenção de saúde e bem-estar.

Lactulose é um dissacárido sintético, obtido da Gal- β 1-4-Fru. Utilizado usualmente devido às suas propriedades laxantes e também por não ser hidrolisado ou absorvido no intestino delgado. Através de estudos *in vitro* e, em modelos animais, foi descoberto que em concentrações sub-laxantes, este apresentava capacidade bifidogénica. *In vitro* e em modelo animal, foi notável o aumento do número de *Lactobacillus* e bifidobactérias existentes no meio. Em ensaios humanos, com uma dose de 3g/dia, foi visível um aumento dos níveis de bifidobactérias e uma (cortar?) consequente diminuição de *Streptococcus*, *Bacteroides* e *Enterobacteriaceae* (Gibson et al., 2010).

A inulina, é um hidrato de carbono vegetal denominado de fructano (Ioannidis et al., 2011). Os fructanos, independentemente do comprimento da sua cadeia, encontram-se bem documentados, no que diz respeito ao seu efeito benéfico exercido nas bifidobactérias. São substratos prebióticos importantes, existem na natureza em alimentos vulgarmente consumidos como, alho, alho-francês, cebola, espargos e chicória. Não é absorvida ou degradada, no trato gastrointestinal superior, não sofre hidrólise por parte das enzimas digestivas, chegando ao cólon na sua forma intacta onde pode ser metabolizada pela microbiota residente. Muitas bactérias são capazes de metabolizar este substrato, incluindo outras como: *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *S. Epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Bacteroides vulgatus*, *B. ovatus*, *B. fragilis*, *Lactobacillus acidophilus* e *Clostridium spp* (Gibson et al., 2010).

Apresenta a capacidade de aumentar os níveis de butirato no cólon, diminuir a severidade da inflamação em modelos animais de colite. Embora não existam doses recomendadas, doses entre 4-20g/dia obtiveram bons resultados. Portanto é sugerido que para se dar efeito bifidogénico, quantidades superiores a 4 g/dia serão necessárias (Tuohy et al., 2003). Estudos indicam que o efeito bifidogénico desta é mais proeminente nos indivíduos que possuem números mais afastados do normal de bifidobactérias, do que naqueles que têm números próximos da normalidade (Gibson et al., 2010; Tuohy et al., 2003).

Os (acrescentar?) Trans Galactoligossacáridos são oligossacáridos que contém galactose, são produzidos a partir de xarope de lactose, através de transglicosilação pela enzima β -galactosidase. Ensaios, *in vitro*, concluíram que é um bom substrato com poder bifidogénico (Slavin, 2013). Apresenta capacidade de diminuir o crescimento bacteriano intestinal indiscriminado (Vieira et al., 2013).

4.2 Mecanismo de ação

O mecanismo pelo qual estes (quais?) promovem a proliferação de bifidobactérias residentes na microbiota humana, encontra-se ainda numa fase meramente especulativa. Sabe-se, no entanto, que através da estrutura molecular destes pode-se determinar o efeito fisiológico e quais as espécies presentes na microbiota capazes de utilizar estes como fonte de carbono e energia (Gibson et al., 2010). Pensa-se que a forma como atua está relacionada com estes três eventos que eles potenciam: diminuição da frequência de defecação, aumento da concentração de butirato dentro do intestino e aumento dos números de bifidobactéria e eubactéria (Tuohy et al., 2003; Vieira et al., 2013).

Existem algumas premissas acerca das bifidobactérias, que ajudam a criar hipóteses, sendo estas as seguintes (Gibson et al., 2010):

- Possuem capacidade metabólica que lhes permite a utilização de uma ampla variedade de oligossacáridos e hidratos de carbono complexos, como fonte de carbono e energia;
- Tem bom crescimento em meios de oligossacáridos não digeríveis em comparação com bactérias putrefativas ou potencialmente patogénicas;
- Em comparação com géneros como *Lactobacillus*, *Bacteroides* e *Eubacteria*, crescem com maior eficiência na presença de prebióticos;
- São tolerantes à produção de ácidos gordos de cadeia curta e acidificação do meio intestinal;
- Na maioria dos casos, não hidrolisam oligossacáridos não digeríveis, no entanto possuem permeases que internalizam estes substratos antes de os hidrolisar e metabolizar. Presume-se que este ato minimize a disponibilidade de açúcares simples para as restantes bactérias intestinais existentes.

4.3 Efeito terapêutico, vantagens e desvantagens

É sugerido por alguns autores que o consumo de prebióticos pode exercer efeito benéfico em algumas áreas como (Slavin, 2013):

- Redução da prevalência e duração de diarreia infecciosa ou associada a antibióticos;
- Redução dos sintomas e inflamação associados a DII;
- Efeito protetor na prevenção do cancro do cólon;
- Aumentar a biodisponibilidade e absorção de minerais como o cálcio, magnésio e, possivelmente, ferro também;
- Diminuir risco cardiovascular;
- Promoção da saciedade, perda de peso e prevenção da obesidade.

Como todos as terapêuticas possuem vantagens e desvantagens no seu uso. Algumas vantagens do uso deste em relação a probióticos são: a sua estabilidade que lhes confere uma longa vida de prateleira nos alimentos onde estão inseridos, não tem a limitação de alguns probióticos em relação aos diversos ambientes ácidos, quer nos alimentos, como no organismo humano alterarem a sua atividade, estimulam a microbiota já existente e a sua capacidade de fermentação não necessitando de competir com microrganismos já residentes. Em relação ao uso de antibióticos também possuem algumas vantagens como o seu consumo poder ser profilático e seguro a longo prazo, não estimular efeitos secundários (exemplo estados diarreicos derivados do seu uso), não criar resistências nem alergias.

No entanto, também, possui desvantagens, que dependendo do ponto de vista podem inutilizar o seu uso em certas situações. Não são tão potentes como os antibióticos na eliminação de patógenos mais específicos e também podem exacerbar os efeitos de mal-absorção de açúcares durante estados diarreicos ativos.(Crittenden & Playne, 2009; Slavin, 2013)

Uma observação bastante particular, retirada de vários estudos, sugere que o efeito bifidogénico observado em populações saudáveis versus o que ocorre em doentes com doenças crónicas intestinais, sugere que o grau de bifidogénese é de correlação inversa, ou seja, este depende da população inicial pré-tratamento. Quanto mais normalizada a microbiota do indivíduo, menor será a bifidogénese.(Crittenden & Playne, 2009; Tuohy et al., 2003)

4.3.1 Efeitos Adversos

Contrariamente aos probióticos, o seu consumo excessivo para além das doses recomendadas diárias, doses superiores a 20g/dia, pode levar a overdose.

Os sintomas de overdose são intestinais podendo apresentar-se como, inchaço, dor, flatulência ou diarreia.

No entanto, em doses baixas, aparentam ser perfeitamente seguros, pois existem em alimentos consumidos diariamente como bananas e cebola.(Crittenden & Playne, 2009; Tuohy et al., 2003)

4.4 Produção

Estes compostos podem ser obtidos por extração a partir de plantas, mas na sua maioria são sintetizados comercialmente por métodos enzimáticos e químicos.

Existem quatro métodos major, diretamente da planta (ex: oligossacáridos de feijões de soja, amido do milho), hidrólise controlada (ex: galacto-oligossacáridos da lactose), transglicosilação(ex: galacto-oligossacáridos da lactose, fruto-oligossacáridos da sacarose), processos químicos (ex: lactulose por isomerização alcalina da lactose, lactilol por hidrogenação da lactose) (Crittenden & Playne, 2009).

4.5 Prebióticos e o seu uso na Colite Ulcerosa

Possivelmente, abordagens que insiram alterações fisiológicas no metabolismo bacteriano poderão ser mais importantes que mudanças filogenéticas na composição, em termos de efeitos benéficos na saúde.

A administração de prebióticos resulta num aumento da população bacteriana de efeito benéfico, acompanhada com um decréscimo concomitante de bactérias putrefativas como classe Clostridia, *Bacteroides* spp. e *Enterobacteriaceae* (Crittenden & Playne, 2009).

Os prebióticos encontram-se bem distribuídos pelas leguminosas, fazendo então parte da alimentação saudável de um indivíduo.

O consumo de alimentos com cevada germinada, contendo proteínas ricas em glutamina (substrato preferencial para os colonócitos) que favorece a integridade da mucosa intestinal e fibras ricas em hemicelulose (eficazes em distribuir butirato pela população do cólon), demonstra eficácia no alívio da sintomatologia em doentes de CU, tanto em modelo animal como em ensaios humanos com doentes de CU. Este não é um prebiótico no sentido estrito da palavra, pois a sua fermentação a nível do cólon é bastante extensa (Geier, Butler, & Howarth, 2007; Tuohy et al., 2003).

Estudos mais recentes, acerca do efeito deste, reportaram estímulo do crescimento de *Eubacterium limosum*. Nos estudos que foram realizados embora tenham reportado

efeitos benéficos, ainda é necessário para suporte científico que se dê um ensaio duplamente cego, randomizado, e com grupo placebo (Geier et al., 2007).

Estudo randomizado controlado, com 18 doentes, utilizando uma combinação simbiótica de fruto-oligossacáridos com inulina. Este ensaio revelou tendência para uma diminuição da inflamação e melhoria na regeneração do tecido epitelial. Também foi reportado uma diminuição das citocinas pró-inflamatórias em associação com um aumento numérico de bifidobactérias associadas à mucosa (Crittenden & Playne, 2009).

Um ensaio randomizado, duplamente cego, com grupo de controlo, estudou 24 doentes com pouchitis. Foi demonstrado que um consumo de 24g/dia de inulina, durante três semanas, apresentou redução na doença a nível histológico e endoscópico.

Um ensaio posterior a este, publicado em 2005, demonstrou melhoria na sintomatologia de doentes afetados com CU, através do efeito bifidogénico da inulina. A lactulose também demonstrou um efeito semelhante num ensaio realizado em doentes com DC e CU. Nestes doentes, o consumo diário, de 20g de lactulose, revelou melhoria na sintomatologia, em relação ao grupo de controlo (Gibson et al., 2010).

Num estudo de pequena magnitude, com grupo controlo a placebo e doentes com CU ativa. A estes foi administrado uma mistura de fruto-oligossacáridos e inulina, numa quantidade de 12g/dia ou um placebo durante duas semanas. Tanto o grupo ao qual estava a ser administrado o prebiótico, como o grupo a placebo, diminuiu a atividade da doença (em relação a linha base, avaliada no dia 0). Esta diminuição não foi estatisticamente relevante, pois não diferiu em grande valor os resultados obtidos pelos dois grupos.

Todos os participantes do estudo entraram em remissão clínica, no entanto dois dos pacientes no grupo placebo possuíam atividade clínica.

Foi verificado pelos autores que o consumo desta mistura prebiótica, por parte dos doentes, levou a que houvesse uma redução nos níveis de calprotectina. Esta redução é importante na medida em que esta substância, que é uma proteína maioritariamente contida nos neutrófilos, e que, por consequência da patologia, normalmente encontra-se em valores bastante elevados nos doentes que sofrem de DII (Brownawell et al., 2012).

Uma das abordagens clínicas aquando do diagnóstico são alterações nutricionais e suplementação, tentado assim reduzir o estímulo antigénico, regular a resposta inflamatória e imunológica e estimular a regeneração da mucosa. Tendo em vista uma redução da sintomatologia, indução e manutenção da remissão clínica. Nesta perspetiva, o consumo de certos vegetais ou seus extratos, podem apresentar-se promissores.

O inibidor Bowman-Birk (IBB), componente bioativo existente em abundância em legumes, como grãos de soja, ervilhas, lentilhas e grão-de-bico. Este composto bioativo, inibidor de protéase, encontrando-se na fração de albumina das leguminosas, não sofre alteração pelo ácido gástrico ou enzimas proteolíticas, chegando assim ao intestino grosso em grandes quantidades e na sua forma inalterada.

Vários estudos sugerem, que para além do seu poder anticarcinogénico, já estudado, tem um potencial anti-inflamatório no trato gastrointestinal.

Este potencial deve-se à capacidade deste inibir proteases de serina. As proteases de serina encontram-se associadas ao processo inflamatório (catapsina G, elastase,...) e, também, ao processo de proliferação celular nas células do cancro do cólon.

Em modelo de colite DSS (dextrano sulfato de sódio), IBB existentes, em grãos de soja ou extratos ricos nestes, expressou potencial. Através da indução de inflamação severa com DSS, o autor averiguou que pela introdução de IBB ocorreu uma diminuição desta inflamação induzida, ou seja, que este composto poderá atuar no processo inflamatório.

Um ensaio clínico, para avaliação da segurança e eficácia de IBB, foi realizado em doentes com CU ativa. O ensaio foi randomizado, duplamente cego, com grupo de controlo. Após 12 semanas, nos doentes que usufruíram da administração de IBB, a terapêutica revelou exercer efeitos benéficos em contraste com o grupo placebo.

No grupo ao qual foi administrado IBB, 50% apresentaram resposta clínica e 36% atingiram remissão, em contraste com o grupo placebo em que respetivamente 29% atingiu resposta clínica parcial e apenas 7.1% atingiu remissão.

Não existiram quaisquer efeitos adversos reportados pelo autor (Utrilla et al., 2015).

No seguimento do estudo anterior, acerca do potencial dos BBI (concentrado, proveniente da soja), Utrilla et al., 2015, no seu estudo abordou em modelo DSS, como anteriormente descrito, apresentando a ervilha como componente de estudo (*Pisum sativum* L.).

Nesse ensaio, o autor dividiu os sujeitos (ratos) em, um grupo controlo ao qual não foi induzida colite, e quatro grupos aos quais foi induzida colite através de DSS. A três dos grupos foi administrado parte do sobrenadante liofilizado (PSE), numa quantidade de 15g/kg.dia, a versão purificada de PSE a AF-PSE (dialisada por água destilada), numa quantidade de 1.5g/kg.dia, e a outro grupo BBI de soja, na forma pura, numa quantidade de 50mg/kg.dia. Esta instituição iniciou-se 2 semanas antes da indução de colite aos sujeitos. Ao quarto grupo foi administrado apenas o veículo usado no ensaio, tampão de

fosfato. O grupo de controlo foi aquele a que foi administrado BBI proveniente de soja, devido hipótese inicial do autor.

A hipótese inicial deste autor era que o efeito inibidor de protéase presente nas frações PSE e AF-PSE. Estas duas frações seriam as responsáveis pelo efeito anti-inflamatório.

A administração iniciou-se duas semanas antes da indução de colite, não se registou alteração no peso dos animais, nem induziu sintomas ou diarreia nestes. Após a indução, os animais que se encontravam com terapêutica instituída, não sofreram na sua maioria tanta perda de peso como o grupo de controlo não tratado. Isto revela que o impacto sofrido, devido à indução de colite por DSS, por parte dos animais que estavam a ingerir prebióticos, foi menor.

Microscopicamente, foram avaliados os outros grupos em relação ao grupo controlo ao qual foi induzida colite. Neste grupo controlo, a ulceração da mucosa epitelial era substancial (mais do que 70% da superfície), ocorreu hiperplasia da cripta, depleção das células caliciformes, inflamação (infiltrados celulares) e edema da mucosa.

Nos animais, sujeitos a prebióticos, estes apresentaram melhoria substancial do processo inflamatório. Nestes histologicamente a arquitetura da mucosa estava maioritariamente preservada, associada a regeneração das células caliciformes e suas mucinas. Apenas, alguns animais apresentavam ainda infiltrados de células mononucleares e o edema apresentado era muito menor. Observa-se, pois, na figura 4, os efeitos benéficos na histologia, como se verifica no elevado estado de preservação parcial, ou quase total, dos três grupos de controlo onde foi induzida colite, após um período experimental de 9 dias.

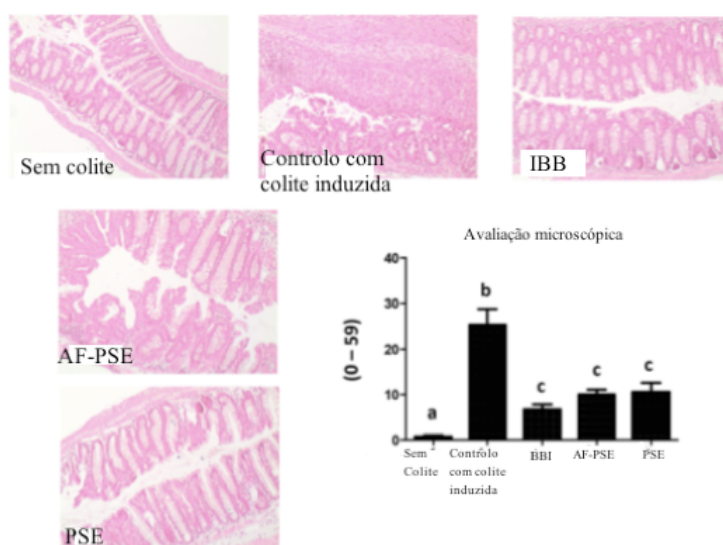


Figura 4- Efeitos a nível histológico da administração de IBB de soja, AF-PSE e PSE, em relação ao grupo controlo. Adaptado de (Utrilla et al., 2015).

Os resultados obtidos, ao nível histológico, reforçam de modo concludente os dados da avaliação da expressão genética de mRNA que na colite se encontra a expressão pronunciada.

Na tabela 9, estão sintetizados os resultados obtidos da inibição genética pelas três combinações administradas, em que a letra “x” corresponde aos pontos em que existe atividade benéfica de decréscimo na expressão do respetivo mRNA. Na tabela 9 é bastante saliente que a atividade de IBB é bastante completa, alterando todos os parâmetros. Em relação a diferença de atividade de PSE para AF-PSE, poderia ser considerado expectável, pois AF-PSE sofreu um processo de purificação ao qual o liofilizado de PSE não sofreu (0 quê?), podendo assim justificar a perda de atividade.

Tabela 9- Registo da atividade dos compostos na diminuição da expressão dos fatores TNF, IL-1 β , IFN- γ , IL-6, IL-12. Adaptado de (Utrilla et al., 2015).

	TNFα	IL-1β	IFN-γ	IL-6	IL-12
IBB	x	x	x	x	x
PSE	x		x	x	x
AF-PSE				x	x

Em termos das enzimas ciclooxygenase (COX) 2 e óxido nítrico sintetase (iNOS) apenas PSE foi capaz de reduzir a expressão genética das duas enzimas simultaneamente, enquanto que BII só atuou na iNOS e AF-PSE na COX2.

Foram encontrados efeitos benéficos na barreira epitelial foram encontrados. Nos animais em que foi administrado PSE, houve um aumento da expressão de MUC3, e das proteínas envolvidas na integridade epitelial a ocludina e a zonula ocludens (ZO-1), comparativamente com o grupo de controlo que também sofreu indução de colite. Os efeitos de IBB foram apenas visíveis no aumento de expressão da ocludina, enquanto que AF-PSE não exerceu qualquer efeito.

Um outro componente, envolvido na resposta imunitária, também foi avaliado em animais, nos quais foi induzida colite, possuíam estes receptores com expressão aumentada. Os animais tratados sofreram diminuição nestes (TLR-2, TLR-4, TLR-6, TLR-9), exceto TLR-2, o qual, apenas PSE foi capaz de diminuir.

A nível da população bacteriana sabe-se que devido a esta patologia, a contagem total bacteriana encontra-se diminuída. Foi verificado pelo autor que o log₁₀ das populações

Lactobacillus, *bifidobactéria*, *bacteroides*, grupo *Blautia coccoides/Eubacterium rectale* e *Clostridium leptum* encontravam-se todas diminuídas, nos animais aos quais tinha sido induzida colite, comparando com o grupo de controlo. Contrariamente, as populações de *Enterobactéria* e o \log_{10} das populações de *Escherichia/Shigella* encontravam-se elevados no grupo de controlo com colite em comparação com o grupo de controlo saudável.

Numa abordagem comparativa entre PSE, AF-PSE e IBB, no que diz respeito às populações bacterianas, os resultados obtidos levantam uma questão importante. Poder-se-ia pensar que por anteriormente ter demonstrado maior poder anti-inflamatório seria esse que elevaria as contagens bactérias benéficas. Esta afirmação não foi de todo verificada pois, dos três compostos o que apresentava maior eficiência na manutenção da integridade da mucosa e efeito anti-inflamatório foi IBB, que revelou em termos de poder bifidogénico exercer efeito limitado, pouco relevante. Os dois compostos que se encontravam em estudo para atividade bifidogénica, comportaram-se como tal, segundo as palavras do autor, restaurando total ou parcialmente, em relação aos valores exibidos pelo grupo de controlo saudável.

A administração de AF-PSE foi a que ofereceu melhores resultados, pois, as contagens logarítmicas, das comunidades de *bifidobactéria* e *bacteroides*, foram iguais às do controlo saudável. O efeito de PSE foi diferente, as contagens logarítmicas das duas anteriores, *B. coccoides/E.rectale*, *C. leptum* e *bacteroides*, foram iguais à existente no grupo de controlo saudável. A particularidade encontrou-se na população *Lactobacillus* que permaneceu baixo em número, não tão baixo como no grupo de controlo induzido com colite, mas significativamente baixo em relação ao grupo de controlo saudável.

Em relação a estes compostos encontrados, na ervilha comum, mostram-se promissores. Como tudo o que é considerado promissor, necessita de desenvolvimento, mais estudos e ensaios de segurança e eficácia em seres humanos e não em modelo animal.

Embora o modelo animal consiga através da indução por DSS, mimetizar a histologia da colite observada no homem, o edema massivo e subsequente ulceração induzida aos animais na fase aguda é equiparável à sofrida por DII. Todos os modelos animais possuem limitações genéticas e metabólicas em relação ao homem. A patologia e o perfil de citocinas são dependentes do tempo de exposição e percentagem de DSS aplicada ao sujeito (Simeoli et al., 2015).

Capítulo 5 - Simbióticos e seu papel na Colite Ulcerosa

5. Simbióticos

Por definição são uma combinação sinérgica, através do uso de probióticos e prebióticos, simultaneamente, criando um efeito benéfico para o hospedeiro. O objectivo, desta suplementação no trato gastrointestinal, é facilitar a atividade, implantação e sobrevivência, de probióticos que tenham atividade *in vivo* bem estudada e estimular o crescimento bacteriano seletivo de géneros como *Bifidobacteria* e *Lactobacillus* da microbiota indígena. (Haskey & Dahl, 2006; Hui, 2006; Patel & DuPont, 2015; E. M. Quigley, 2011; Tuohy et al., 2003)

A lógica, por detrás, desta abordagem, apoia-se na palavra sinergia, criar atividade sinérgica entre dois compostos. A utilização de um probiótico e prebiótico (de atividade individual cientificamente comprovada), para o potenciamento da ação terapêutica, que deverá ser superior à obtida individualmente. Pode-se, no entanto, dar o caso de o prebiótico não ser eficaz, por si só, sendo apenas “útil” na presença de um probiótico, o qual irá estimular, elevando o valor terapêutico (Geier et al., 2007).

Para ser feita a escolha de qual a melhor combinação, necessitam-se mais estudos. Um bom exemplo de atividade destes, é a junção de *B. longum* e uma mistura de fruto-oligossacáridos e inulina. Estes demonstraram redução nos sintomas clínicos e, também, na diminuição da expressão de citocinas inflamatórias, em doentes com CU (Scott et al., 2013). Infelizmente não existem muitos estudos, para se ter dados concretos acerca da segurança e eficácia (Ho et al., 2015).

Esta abordagem é apenas um passo lógico, que se encontra desde há muito aplicado na terapêutica farmacológica. É um conceito clássico, em que se utiliza dois fármacos, dado que a junção dos dois supera a utilização da cada um em separado. Isto é feito quando os mecanismos dos respetivos tratamentos são diferentes mas complementam-se. A ideia original para o uso de simbióticos é baseado na importância da microbiota intestinal e o seu papel nas DII (Ocón et al., 2013).

5.1 Simbióticos e a sua intervenção na Colite Ulcerosa

Existe um número diminuto de estudos em comparação com os existentes para os probióticos, que averiguem evidência científica robusta. Na maioria dos ensaios, o

modelo usado é o animal ou então uma amostra pequena de doentes com CU, o qual comporta algumas limitações.

Um pequeno estudo realizado em 2005, por Furrie *et al*, 2005, com 18 doentes, utilizou à época uma nova mistura em que associou *B. longum*, contendo uma cápsula 2×10^{11} de liofilizado de bactérias viáveis em combinação com o prebiótico “Synergy 1”, um substrato para o probiótico à base de inulina-oligofrutose, numa saqueta contendo 6g.

O autor concluiu que o consumo do simbiótico, duas vezes por dia, por um período de 4 semanas, reduz os marcadores de inflamação da mucosa. Antes do tratamento a média de doentes com PCR era de 6.0 e passou, após as 4 semanas, a 1.8 de média.

Este estudo é, no entanto, bastante limitado devido à reduzida amostra.

Fujimori *et al*, 2009, realizou um estudo com âmbito de averiguar a eficiência de simbióticos versus probióticos e prebióticos, usados individualmente, na manutenção da remissão.

O mesmo autor utilizou uma amostra de 120 pacientes, que foram randomizados em 3 grupos constituídos cada um por 40 sujeitos. Todos os sujeitos já se encontravam a utilizar aminosalicilados e/ou prednisolona em doses estáveis, que foram mantidas durante o decurso do ensaio.

Os grupos que foram selecionados para que seja administrado probiótico e prebiótico separados, passaram a grupos de controlo para o simbiótico, pois este foi um estudo sem a introdução de placebo como grupo de controlo.

O probiótico utilizado foi *Bifidobacterium longum*, numa dose de 2×10^9 UFC, por cápsula, uma vez por dia, o prebiótico utilizado foi psilium numa dose de 4.0 g dissolvido em 100 mL de água, duas vezes por dia. O simbiótico utilizou as doses anteriores mas de toma conjunta por um período de 4 semanas.

Os resultados obtidos, por este autor, foram bastante favoráveis. Obtiveram significância estatística na melhoria da qualidade de vida dos doentes, induzida pelo simbiótico, sendo provavelmente benéfico na manutenção da remissão e diminuição de sintomas. Os doentes, neste grupo, mantiveram remissão na 2ª e 4ª semanas do estudo, com diminuição no final do estudo da PCR. A evolução verificada, ao longo do estudo, quer no probiótico quer no prebiótico, não permitiu registar significância estatística.

Embora tenha obtido resultados favoráveis, o autor refere criticamente que o período de estudo pode ser curto demais para avaliar devidamente o efeito ou mesmo testar este tratamento para a manutenção da remissão.

Realizou-se, ainda, um estudo randomizado, com um grupo de controlo, de 18 participantes, todos com CU ativa. Houve administração de uma mistura do probiótico *Bifidobacterium longum* com uma mistura de prebióticos (mistura de 6 fruto-oligosacáridos com inulina).

Os resultados obtidos foram positivos, ocorrendo redução na sintomatologia e um efeito bifidogénico. No entanto, as diferenças entre os grupos foram apenas marginalmente significantes neste ponto. Verificando-se alguma variação estatística, nas concentrações de mRNA referentes a hBD (β -defensinas humanas), que numa fase anterior ao tratamento, se encontravam diminuídas em relação ao aumento observado no final do estudo.

Os autores verificaram neste estudo uma diminuição no TNF, redução na inflamação e regeneração epitelial, em comparação com o grupo placebo (Brownawell et al., 2012).

Em modelo animal, um dos autores utilizou um derivado extraído de Basidiomycetes, um composto ativo correlacionado com hexose (AHCC). Composto este cuja estrutura é composta de 74% de oligossacáridos, especialmente α -glucanos. Sinergicamente usado com uma estirpe de *Bifidobacterium longum* BB536 (dose 5×10^6 UFC rato⁻¹ dia⁻¹). O autor refere, ainda, que anteriormente já avaliou AHCC e que o mecanismo de ação deste era consistente com o de um prebiótico.

A experiência decorreu de modo a separar os animais, em pequenos grupos, por questões de ordem ética. Começou-se por escolher um grupo de controlo, induzido com colite, tendo preparado dois grupos com duas doses de prebiótico, apenas, administrando um simbiótico a dois outros grupos, cujas doses de prebiótico foram distribuídas respetivamente com 100 mg kg⁻¹ e 500 mg kg⁻¹.

A extensão da inflamação nos grupos a simbiótico foi inferior, daí poder-se afirmar que o período de recuperação tenha sido mais rápido. Todos os grupos, excetuando o grupo de controlo, demonstraram uma diminuição da secreção de IL-2 e IFN- γ , o que permitiu ao autor inferir que a opção que obteve melhores resultados foi - o tratamento simbiótico.

Na dose de 500 mg kg⁻¹, houve diminuição em cerca de 40-50% dos parâmetros inflamatórios (dano ao cólon, extensão do dano, área com necrose). O probiótico, já referenciado pelo autor, comportou-se como este esperava, inibindo a degradação de glicosaminoglicans pelas bactérias intestinais, melhorando a severidade da patologia (Ocón et al., 2013).

O objetivo do estudo foi verificar a possibilidade de prevenir ou reparar o dano causado, a nível do cólon, pela colite, através do tratamento simbiótico de *Lactobacillus paracasei* B21060 com os prebióticos fruto-oligossacáridos e arabinogalactano (proveniente da madeira da árvore), tendo sido administrada uma mistura comercial, Flortec junior (Bracco SpA), em saquetas de 6g, que continha aproximadamente 2.5×10^9 UFC de bactérias viáveis.

A dose foi ajustada pelos autores, de encontro às necessidades, devido ao modelo animal ser de porte pequeno, 2.5×10^7 bactéria/10g de peso corporal, fruto-oligossacárido 7mg/10g de peso corporal e arabinogalactano.

Randomizou-se os animais que foram separados em quatro grupos:

1º grupo – recebeu, apenas, água;

2º grupo – recebeu DSS para indução de colite;

3º grupo – Recebeu DSS, mais simbiótico, uma vez por dia. Ressalvando-se que neste grupo foi avaliado o efeito preventivo do simbiótico, tendo sido administrado com uma antecedência, de sete dias, em relação ao DSS;

4º grupo – Recebeu, por sua vez, DSS mais simbiótico, uma vez por dia. Neste último grupo, foi efetuada uma avaliação terapêutica em que a administração do simbiótico ocorreu dois dias após o início da toma de DSS.

Em termos de resultados obtidos, pelos autores, macroscopicamente observaram-se uma diminuição significativa na expansão dos agregados linfóides e uma menor redução no tamanho do cólon, nos sujeitos, aos quais, foi administrado o simbiótico. Tendo o grupo 4 obtido um melhor resultado que o grupo 3, mas não muito diferentes do grupo de controlo 1.

Este estudo demonstrou a capacidade do simbiótico em diminuir todos os parâmetros avaliados pelos autores. O simbiótico demonstrou que possui uma elevada capacidade protetora contra a perda de peso, redução da inflamação e efeito protetor da integridade e funcionalidade da barreira epitelial. Os dados apoiam o efeito imunomodulador, desta estirpe, devido ao menor dano da mucosa e tecidos, e prevenção do recrutamento de neutrófilos.

A diminuição do recrutamento de neutrófilos foi relacionada com uma diminuição das concentrações de mieloperoxidasas. Os danos pelo stress oxidativo, causado por espécies reativas de oxigénio e azoto, são considerados um dos maiores contribuintes

para o dano no cólon. Verificou-se uma melhoria no tempo de resolução da inflamação, pois o simbiótico diminuiu a perda de peso.

Houve, também, evidência da restauração dos níveis de IL-10 e diminuição das citocinas (IL-1, IL-6 e IL-12) e quimiocinas inflamatórias. A expressão genética de MUC-1 que se encontrou alterada pela colite induzida, foi restaurada pelo simbiótico, no que se refere à mistura prebiótica, que para além do efeito bifidogénico, apresenta uma boa(?) capacidade para diminuir a atividade da doença e melhorar os níveis de calprotectina fecal (Simeoli et al., 2015).

Capítulo 6 – Transplante Fecal na remissão da Colite Ulcerosa

5. Transplante Fecal

O Transplante Fecal de Microbiota, também denominado de “infusão fecal” ou de “bacterioterapia fecal”, é uma opção terapêutica que envolve administração de um filtrado fecal líquido que contém uma composição microbiana (microbiota distal do intestino grosso), de um dador que possua uma microbiota com as características, consideradas normais, a um doente com uma doença ou condição que esteja relacionada com disbiose ou alteração na microbiota normal.

O objetivo, desta técnica, é restaurar a diversidade filogenica e a microbiota para uma que possua as características encontradas numa pessoa considerada saudável (Cammarota et al., 2014; Kelly et al., 2015; Matsuoka et al., 2014).

Variantes, desta técnica, tem sido usadas, desde a antiguidade, através de relatos do século IV, na China, relatam o uso de suspensões fecais administradas, por via oral, para o tratamento de intoxicações alimentares e estados diarreicos severos. Desde o século XVII tem sido extensamente usado em veterinária para tratar distúrbios ruminais. Durante vários anos, esta terapêutica foi pouco usada, ou mesmo quase esquecida. A sua utilização é constantemente associada à terapêutica de ICD recorrente, pois foi na terapêutica desta infeção em que se obtiveram resultados palpáveis e existe uma grande amplitude de estudos realizados, acerca desta matéria, assim como, protocolos e metodologias bem definidas (Aroniadis & Brandt, 2012; Venugopalan, Shriner, & Wong-Beringer, 2010).

A sua primeira tentativa de uso humano documentada, deu-se em 1958, na tentativa de tratar a colite pseudomembranosa causada por *Micrococcus pyogenes*, através de enemas a quatro doentes. No caso de ICD, (principal patologia que usufrui desta abordagem terapêutica), o seu primeiro caso documentado de sucesso terapêutico foi numa ICD, em 1983, também, tendo como via enemas fecais (Bäckhed et al., 2012; Brandt & Aroniadis, 2013; Kelly et al., 2015; Vrieze et al., 2013).

A primeira aplicação desta técnica, em 1989, no que diz respeito á CU, foi dada a conhecer à época através de um dos autores do artigo, tendo sido ele próprio sujeito a TMF tornando-se um caso de sucesso, segundo este, em que se declara que após o transplante entrou em remissão clínica, sem auxílio de medicação adjacente (Matsuoka et al., 2014). No seguimento do uso de enemas, surgiram, em 1991, infusões fecais

administradas por sonda nasogástrica, gastroscopia em 1998, colonoscopia em 2000 e, em 2010 enemas de auto-administração (Brandt & Aroniadis, 2013).

A partir do seu primeiro uso, esta técnica foi ganhando reconhecimento, sendo considerada e bem aceite pela comunidade médica e civil, por ser “natural”. Hoje em dia, os doentes encontram-se cada vez mais informados, devido ao acesso livre que a maioria tem à Internet. Ao efetuarem pesquisa acerca da sua patologia encontram múltiplas referências a esta abordagem terapêutica.

Estudos baseados em doentes com ICD indicam que as mulheres são menos propensas a aceitar a opção que os homens, enquanto que segundo a idade constou-se que os doentes mais idosos aceitam melhor que os mais jovens. Dos doentes que já receberam um TMF, 97% referem que, caso seja necessário, futuramente iriam repetir esta opção terapêutica em vez de recorrerem a antibióticos. (Brandt & Aroniadis, 2013)

Os microrganismos que compõe a microbiota são fundamentais para a manutenção da saúde no hospedeiro, a sua complexidade é comparável ao sistema de órgãos humanos. No que concerne à disbiose, já abordada, a alteração da composição de microrganismos natural, já foi implicada em mais que uma patologia, sendo um exemplo de simples infeção por *Clostridium difficile* (ICD). Existem dados concretos que a aplicação desta técnica a ICD recorrente, demonstra eficácia, o que permite afirmar que se aplicada a outras patologias que resultam de uma alteração da microbiota, também poderão usufruir deste método (Kelly et al., 2015; Ocón et al., 2013).

Trata-se de um método que é considerado simples de executar, as questões que se levantam, acerca dele, surgem devido à falta de dados concretos sobre a segurança a curto e a longo prazo. É uma técnica que precisa de ser aprimorada, e preparada para o desenvolvimento de metodologias, procedimentos concretos e, acima de tudo, dados robustos acerca da sua segurança divulgação de resultados robustos quanto à sua segurança (Kelly et al., 2015).

5.1 Transplante Fecal na remissão da Ulcerosa

Casos preliminares do uso de enemas de TMF, no tratamento da CU, apresentaram resultados promissores. Reportando que os pacientes atingiram remissão clínica e sua manutenção e, nalguns casos, a longo prazo. Alguns dos sujeitos apresentaram também remissão histológica e endoscópica.

Após estes relatos, seguiram-se estudos de pequeno calibre na população adulta e infantil, com CU, DC e pouchitis. Nestes não foi possível obter dados com robustez

acerca da eficácia e segurança. Isto pode ter-se verificado devido ao facto de não serem estudos de grande escala, serem estudos “open label”, pouco uniformes na via de administração e no protocolo usado para tal. Uma meta análise de 18 estudos, que incluiu 122 doentes, que sofriam de IBD, e foram alvo de TMF, a remissão clínica foi de 45%. No entanto, ao eliminar alguns dos estudos para diminuir viés, esta percentagem decaiu para 36,2%. Pode, no entanto, não ser o melhor exemplo, pois, integra outras para patologias para além da desejada neste caso. (Kelly et al., 2015)

Relatando dois ensaios aleatórios com um grupo de controlo e outro de administração de placebo. O primeiro ensaio realizado, por Moayyedi *et al.*, 2015, em 75 doentes com CU ativa, foram aleatoriamente selecionados para TMF, com periodicidade semanal, tendo o segundo grupo recebido, enemas compostos por água, semanalmente também, durante 6 semanas.

Estatisticamente houve um efeito positivo do TMF na indução da remissão, com 9 dos 38 (24%) presentes no grupo que recebia TMF, versus 2 de 37 (5%) que se encontravam no grupo placebo. A proporção de doentes que sofreu melhoria de sintomas não foi considerada estatisticamente relevante. Não foram descritos eventos adversos após TMF.

O segundo estudo teve a participação de 50 doentes com CU ativa e classificada como moderada a severa. A distribuição foi aleatória relativamente às fezes doadas ou transplante autólogo, administração por via de um tubo nasoduodenal. TMF foi administrado no início do estudo e após um período de espera de 3 semanas apenas 37 doentes atingiram remissão. Não existiu diferença estatística de remissão clínica e endoscópica, nos dois grupos. Atribuiu-se a incapacidade de verificar diferença estatística, por falta de recursos para tal.

Há fatores determinantes que influenciam de modo transversal os resultados, deste tipo de estudos, a saber: características da DII de cada doente, variabilidade do dador, dose administrada, frequência do TMF e o uso concomitante de outras medicações (Kelly et al., 2015). Kelly *et al.*, propõem então que os próximos ensaios acerca de TMF sejam feitos, não com a CU no estado ativo, mas sim, após a sua remissão clínica já se encontrar presente.

Dois estudos prospetivos publicados, em 2013, com um numero pequeno de doentes, respetivamente cinco doentes e seis doentes, realizados em adultos. Nenhum dos estudos referidos foi um ensaio clínico controlado, no entanto ambos analisaram

longitudinalmente a composição bacteriana e mudanças nestas através de pirosequenciamento tendo como alvo 16s rRNA.

Nenhum dos estudos obteve sucesso na indução de remissão, após o transplante, apenas observaram alteração significativa da composição da microbiota em 8 dos 11 doentes. Num dos estudos, verificou-se que num dos doentes foi correlacionável melhoria terapêuticas com a colonização bem sucedida.

Ambos os estudos concluíram que a alteração da microbiota foi temporária, que seria necessário transplantes periódicos para a manutenção da composição. A tendência verificada por Kump *et al.*, 2013, foi de aquisição da composição do dador passados 30 dias, que após essa data entrava em decaimento, chegando aos 90 dias com a microbiota exatamente igual à que apresentaram antes da realização do transplante. No mesmo estudo ocorreu num dos participantes que a microbiota com a qual ficou, não era a sua inicial nem a do dador (Angelberger *et al.*, 2013; Kump *et al.*, 2013).

No estudo realizado, por Kump *et al.*, é de notar se todos os 5 dos 6 sujeitos já tinham sido sujeitos a terapêutica com TNF- α , o outro a pelo menos um imunossupressor. Aquando do ensaio 1 encontrava-se a ser tratado concomitantemente com TNF- α e os outros 5 com ácido 5-aminosalicílico (Mesalazina). Afirmando que ainda se encontra em aberto a possibilidade de que se houver ausência de terapêutica prévia com TNF- α , com a doença na sua forma ligeira a moderada, usufruirá de melhores resultados com TMF (Matsuoka *et al.*, 2014).

Matsuoka *et al.*, aborda um ensaio clínico de fase I, em doentes dos 5 aos 30 anos, cuja data de finalização no site ClinicalTrials.gov (<http://clinicaltrials.gov/>) dá como data de fim julho de 2017, pelo que a data não possui os dados de fim para consulta apenas o verificado até agora.

Não foram verificados efeitos adversos severos, e a percentagem de resposta clínica foi elevada cerca de 79% na primeira semana. Estes últimos dados referem-se a 10 doentes pediátricos, o que pode levar a pensar que nem todas as faixas etárias beneficiaram equitativamente de melhorias terapêuticas.

Angelberger *et al.*, por sua vez, embora não tenha tido resultados terapêuticos palpáveis, contribuiu com a identificação de grupos bacterianos que são indicativos da severidade da doença e sucesso da TMF, como aumento de *Enterobacteriaceae* e diminuição de *Lachnospiraceae*. No entanto, o único doente em que houve alteração da microbiota foi aquele que apresentou resposta sintomática ao TMF, no qual ocorreu um aumento PCR durante um período curto.

Em contraste com os estudos anteriores, meta-análise realizada por Anderson et al. 2012, citada por Smits *et al.*, 2013, afirma que 63% dos sujeitos entraram em remissão, 76% cessaram a toma de medicação para DII e que 76% apresentaram redução nos sintomas gastrointestinais. No entanto este autor não referenciou o número de sujeitos utilizados na análise de Anderson *et al.*, 2012.

Estudo de pequeno calibre em população pediátrica com 10 sujeitos de idades entre 7-21 anos, estado da doença classificado de ligeiro a moderado. Receberam enemas durante 5 dias consecutivos, 7 desses apresentaram resposta clínica, mas apenas 3 atingiram remissão no período de uma semana (Davidovics & Sylvester, 2013).

É de notar que este estudo embora apresente dados promissores, não pode ter grande impacto, devido à pequena amostra que foi utilizada pelo investigador.

Um estudo publicado, recentemente, de modelo duplo cego randomizado, controlado de TMF versus uso de placebo, numa população com CU ativa, cuja amostra de 70 doentes, com idades superiores a 18 anos, com terapêutica concomitante e CU ativa.

Os resultados clínicos deste estudo publicado em 2015 são promissores.

Existem alguns resultados que merecem ponderação, um deles, é que foi atingida significância estatística no que diz respeito à indução de remissão através de TMF e que em 9 doentes de 38 (24%) foi obtida versus 2 em 37 (5%), no grupo que se encontrava a placebo. Histologicamente avaliaram os doentes que se encontravam em remissão, aquando da sétima semana, em 7 dos doentes que foram alvo de TMF e se encontravam em remissão, não foi encontrado sinais de inflamação em nenhuma das biopsias realizadas, nos outros 2 restantes do mesmo grupo exibiam inflamação moderada na zona retal.

Nos 2 doentes pertencentes ao grupo placebo que atingiram remissão, 1 deles, não tinha sinais de inflamação ativa em contraste com o outro membro que exibia inflamação ativa moderada em todas as biopsias. Existiu também relação ao dador ser um ponto importante, neste estudo 7 de 18 (39%), que utilizaram as amostras do mesmo dador terem chegado a sucesso terapêutico enquanto que 2 de 20 (10%) foi o obtido com os restantes dadores, o que sugere evidência estatística.

Outra tendência verificada é a de doentes que estão concomitantemente a usar terapêutica de imunossupressora beneficiam em maior escala do TMF. Acresce referir que doentes que tenham sido diagnosticados recentemente versus os que exibem doença crónica tem maior probabilidade de responder à terapêutica que o segundo grupo.

Face ao restante, no entanto não foi estatisticamente relevante a melhoria na qualidade de vida e diminuição de sintomas.

Fazendo um balanço dos resultados terapêuticos finais dos doentes que foram selecionados para TMF, 8 dos 9 doentes que se encontravam em remissão mantiveram até à semana 52 qualquer recidiva, por isso, 4 destes 9 doentes resolveram cessar a sua medicação concomitante (Moayyedi et al., 2015).

Em linha com o estudo anterior e, no mesmo ano, outro autor publicou os resultados do ensaio clínico TURN (Transplantation of feces in Ulcerative Colitis; Returning Nature's Homeostasis), um ensaio clínico duplamente cego, randomizado e com grupo placebo de controlo, exatamente como o estudo anterior, com uma população de 48 doentes com CU ligeira a moderada.

Neste estudo foi adicionado como critério de exclusão uso de TNF- α e metotrexato durante 8 semanas, antes da inclusão no estudo, ciclosporina até 4 semanas antes da inclusão, nem o uso probióticos ou antibióticos nas 6 semanas que antecederam o estudo.

A análise de redundância demonstrou que a composição da microbiota de um dos grupos do ensaio, que na linha de base se encontrava igual ao dos doentes que não apresentaram resposta à terapêutica, na 12ª semana, se alterou assemelhando-se à dos dadores. Esta alteração foi explicada pelo reaparecimento dos clusters de *Clostridium* apresentados em indivíduos saudáveis.

No entanto, os resultados obtidos não foram considerados estatisticamente relevantes, no que diz respeito à remissão clínica e à melhoria observada endoscopicamente.

Os resultados, deste autor, mostraram que uma abordagem standard pode não beneficiar a todos os doentes. Num dos grupos os doentes que responderam à terapêutica, a tendência foi a de adquirir uma microbiota à semelhança do dador, enquanto que no mesmo grupo aqueles que não responderam à terapêutica estagnaram não havendo alterações de composição. Por contraste com o outro grupo existente no estudo, dentro da população que apresentou resposta, a tendência da microbiota foi tornar-se mais rica em *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Bacillus*.

Observou-se que no protocolo, o uso de 2L de Macrogol induz alteração na quantidade de *Proteobacteria* existente nos sujeitos saudáveis até 2 dias após a administração (Rossen et al., 2015).

Os dados obtidos são ainda muito precoces. Embora existam estudos que apresentem ligeiras melhorias, outros que descreditem, não invalida casos de sucesso particulares.

É necessário perceber qual será a posologia adequada e se esta será para um grupo ou terá de ser instituída particularmente.

5.2 Metodologia

Tendo em conta que o seu uso tem sido intermitente, desde o século IV, ainda não foi conseguido um protocolo standard que esteja assente em evidências terapêuticas, continuando assim em aberto a tentativa de construir um protocolo válido (Brandt & Aroniadis, 2013).

5.2.1 Rastreio de dadores

Dadores saudáveis poderão ser considerados familiares diretos, amigos ou até encontrados através de anúncios.

TMF possui o risco de transmissão de agentes infecciosos, impondo-se a necessidade de implementar um rastreio rigoroso (Brandt & Aroniadis, 2013; Smits, Bouter, De Vos, Borody, & Nieuwdorp, 2013).

As fezes devem ser despistadas para a possível existência de patógenos como o descrito na tabela 10 (Brandt & Aroniadis, 2013; García-García-de-Paredes et al., 2014).

Tabela 10- Rastreio standard a dadores para TMF. Adaptado de (Brandt & Aroniadis, 2013; García-García-de-Paredes et al., 2014).

Pesquisa	
Fezes	Toxina de <i>Clostridium difficile</i> Antígeno de <i>Giardia</i> Antígeno <i>Helicobacter pylori</i> Antígeno <i>Cryptosporidium</i> <i>Isospora</i> Rotavírus
Serologia	Hepatite A (pesquisa de IgM) Hepatite B (pesquisa de antígeno de superfície, IgG e IgM e anticorpos) Hepatite C (pesquisa de anticorpos) HIV tipo 1 e 2 Sífilis

Perante a existência de *Helicobacter pylori*, também é prudente ser analisada, para qualquer que seja a via de administração usada.

O único momento em que se poderá recorrer a fezes não rastreadas, será quando o risco para o doente é iminente e a avaliação risco/benefício assim o ditar (Aroniadis & Brandt, 2012; Brandt & Aroniadis, 2013).

5.2.2 Critérios de exclusão de dadores

É necessário a existência de critérios que permitam manter a segurança dos recetores acima de tudo, tendo em conta a observação anterior, os critérios a considerar são os seguintes (Aroniadis & Brandt, 2012):

- Uso de antibióticos 3 meses antes, pois os efeitos na flora microbiana podem se manter mesmo após fim da terapêutica durante três ou mais meses;
- Comportamentos sexuais de risco;
- Viagens realizadas;
- Transfusões sanguíneas;
- Piercings ou tatuagens nos últimos 3 meses;
- Historial de encarceração;
- Historial clínico de diarreia, obstipação, IBD, IBS, pólipos coloretais, cancro, imunodepressão, obesidade mórbida, síndromes metabólicas, atopia, fadiga crónica. Pois, todos os acima mencionados, podem ser transmissíveis aquando da inoculação com fezes contaminadas;
- Outros factores, como doenças autoimunes, cirurgias extensas, alergias alimentares ou a medicamentos, deverão ser analisados como factores de exclusão.

Existe escolhas preferenciais nos dadores (familiares, parceiro ou cônjuge, amigos próximos), uma revisão sistemática concluiu que um dador próximo como cônjuge ou parceiro é preferível, no caso de ICD, a percentagem de sucesso é de 82,7-90,5%, enquanto que de um indivíduo que não é próximo se encontra nos 84%.

Quanto maior a proximidade do dador com o recetor, menos o risco de transmissão de doenças, pois quanto maior a proximidade maior a probabilidade de contacto com os mesmos factores e doenças, ou seja, menor é a probabilidade de os transmitir ao recetor, pois partilham ambiente semelhante, estando expostos aos mesmos factores.

Estudos mais recentes demonstraram que a preferência por dadores poderá não ser tão importante como antes referido. Experiências recentes com dadores universais, demonstraram percentagens de remissão de 90-92%, com recorrência de ICD inferior a 10%. Esta afirmação abre portas para doentes que não possuíam dadores directos (familiares) passíveis de efetuar a doação (Brandt & Aroniadis, 2013; Cammarota et al., 2014; García-García-de-Paredes et al., 2014).

Uma nova premissa foi introduzida na seleção do dador a utilizar. Em vez de a única preocupação se centrar no que é descrito de critérios de exclusão e possíveis patógenos existentes, mais importante seria avaliar a quantidade viável de componentes benéficos ou de bactérias com capacidade anti-inflamatória. Esta hipótese é apoiada pelos resultados obtidos por Kump et al., em que usando uma única fonte de amostra para todos os doentes, não foi obtido um resultado uniforme na melhoria dos doentes, o que indica que possivelmente o perfil inflamatório de cada indivíduo deve ser distinto, em que as quantidades de bactérias anti-inflamatórias devem ser ajustadas à pessoa.

5.2.3 Via de administração

Administração pode ser feita por diversas vias, nasogástrica, tubo nasoentérico, colonoscopia gastroduodenal ou sigmodeia, ou enema.

As fezes devem ser agitadas manualmente e, preferencialmente, o dador deverá tomar um laxante moderado, na noite anterior à recolha, para assegurar que seja mantido o perfil de suspensão. A doação deve ser colocada num recipiente de plástico transparente, não ser congelada, embora possa ser refrigerada antes do seu uso, consensualmente muitos autores referem, tanto em ICD, como CU, o uso de fezes num intervalo de 6h após colheita (Brandt & Aroniadis, 2013; Rossen et al., 2015).

A via nasogástrica ou nasoentérica é rápida, conveniente, fácil, de baixo custo ao contrário do que é necessário para uma endoscopia.

Se for administrado por via superior, o trato gastrointestinal será na sua íntegra exposto às fezes, no entanto não existem estudos que comparem a exposição da via inferior (colonoscopia) versus a via superior. No caso da via superior, os ritmos de perfusão e volumes são inferiores aos que são administrados pela via retal (Brandt & Aroniadis, 2013).

Teoricamente com base em dados de ICD, a colonoscopia é considerada mais fiável em relação a enemas de retenção, pois o enema só atinge no máximo o cólon esquerdo, enquanto que por colonoscopia a exposição do cólon é integral. A via irá influenciar o crescimento bacteriano, pois, este é influenciado pela sua passagem pelo trato gastrointestinal, ou seja, a via pela qual a administração é feita deve ter em conta as espécies bacterianas que irão colonizar.

Um exemplo desta preocupação a ter em conta é o facto da filo *Firmicutes*, formadoras de esporos, necessitarem de percorrer o trato gastrointestinal completo para exercer o seu efeito, assim como, *Bacteroidetes* são afetados negativamente pelo ácido gástrico,

ou seja, para esta a via de administração inferior é preferível. Uma boa opção a considerar seria uma abordagem mista, via superior em conjunto com via inferior, mas para esta abordagem ainda não se encontram estudos publicados (Cammarota et al., 2014).

Atualmente devido à ausência de protocolos bem delineados, o número de intervenções ou mesmo o período de latência entre cada uma encontra-se bastante indefinido, tornando-se uma barreira para a prática corrente e indiscriminada da técnica. Um estudo, com bons resultados, em que a microbiota atingida pelos doentes foi semelhante à dos dadores, foi por via retal em que num estudo foram usados enemas diários durante um período de 5 dias e, noutro estudo, uma implantação única por colonoscopia (Kump et al., 2013).

Em ambos os estudos a microbiota atingiu semelhança à microbiota dadora, esta afirmação levanta questões importantes do ponto de vista terapêutico, de qual a via e número de administrações necessárias para cada um.

5.2.4 Preparação da amostra

Um exemplo descrito, na literatura, inicia o processo por uma lavagem do cólon com recurso a polietilenoglicol 3350(PEG 3350) antes das amostras serem colectadas. A recolha é feita apenas de uma dejeção. O diluente usado foi uma (acrescento?) solução salina estéril, em seguida a amostra é alvo de duas filtrações através de gaze para remoção de componentes de grande volume. Obtém-se, deste processo, 300-500 mL de suspensão, contendo a flora do dado, que é colocada em seringas de 20mL. É guardada uma alíquota com amostra original das fezes do dador, para análise mais detalhada (Kump et al., 2013).

O tipo de diluente e a quantidade a ser adicionada deste dependem do necessário para que se atinja a consistência desejada para ser injetada pelo tubo utilizado como acessório à via de administração utilizada.

Por norma, as fezes são suspensas em soluções salinas bacteriostáticas, no entanto água ou outros diluentes (ex. leite) poderão ser utilizados.(Brandt & Aroniadis, 2013)

Existem, ainda, muito poucos dados fornecidos pelos estudos existentes, ou seja, os dados são bastante heterogéneos, o que não permitem de momento obter conclusões sólidas. É, no entanto, descrito por que o uso de preparações cujo diluente é a água atingem percentagens favoráveis de resolução da doença comparando com o uso de

solução salina (98,5 versus 86%, respectivamente).(Brandt & Aroniadis, 2013; Cammarota et al., 2014; García-García-de-Paredes et al., 2014; Smits et al., 2013)

Noutros estudos, igualmente atuais, verifica-se eficácia equivalente, quer as amostras fecais sejam frescas ou congeladas. Este facto pode levar à implementação de bancos de doação de fezes. São necessários mais estudos, no âmbito da preparação, em que se verifique qual o melhor método para preparar a suspensão, agitação manual versus mecânica (mecânica pode introduzir ar e danificar a viabilidade dos anaeróbios estritos) (Smits et al., 2013).

Não existe uma quantidade definida atualmente para TMF, no entanto encontram-se na maioria das quantidades usadas entre os 50 a 60g de amostra fecal, suspensos em 250 a 300 mL de diluente. (Brandt & Aroniadis, 2013)

Um estudo, referente a CU, utilizou 120g de amostra, por se situar no interquartil 85-208g. (Rossen et al., 2015)

Para a administração por via inferior (colón), ronda os 300 mL e para a via superior 60 a 75 mL. (Brandt & Aroniadis, 2013)

5.2.5 Protocolo para o receptor

Kump et al., utilizou o seguinte protocolo na sua investigação. O recetor deve efetuar uma lavagem intestinal com soluções de PEG. Após esta preparação inicial será realizada a colonoscopia. Outro autor, num estudo elaborado com doentes com CU, utilizou como protocolo de pré-lavagem intestinal, 2L de Macrogol, mais 2L de Moviprep, num total de 4L, a ser feito na noite antes e na própria manhã do transplante. (Rossen et al., 2015)

Também referente a ICD, está protocolado o uso de loperamida oral, em dose única, ou em doses múltiplas de 2mg, até atingir 8mg, o que pode auxiliar na retenção da solução fecal transplantada. Não é consensual, a utilidade desta, pois, variados autores, com e sem o uso de loperamida, mantiveram resultados lineares.

Na tentativa de aumentar a viabilidade no caso do trato utilizado ser o superior, o recetor recebe inibidores da bomba de protões na noite anterior e na manhã do transplante, pois como já foi referido, existem espécies que são suscetíveis a ambientes ácidos que lhes diminuem a viabilidade (García-García-de-Paredes et al., 2014).

No decorrer da colonoscopia, serão inseridas no cólon e no íleo, frações de 20mL que no total somadas serão cerca de 300 a 500mL de suspensão. Após o procedimento, por

precaução, é dado ao doente loperamida, para atrasar o trânsito intestinal, dando tempo para que ocorra a colonização do intestino pelas bactérias do dador (Kump et al., 2013).

5.3 Comunidade microbiana após TMF

Este ato médico pode levar a uma alteração considerável da composição da microbiota a nível filogénico tanto nas amostras fecais como da mucosa do cólon.

Kump et al., descreve a diminuição da filo Proteobacteria em relação ao nível avaliado, como ao de base, tanto nas amostras fecais como nas da mucosa. O Aumento de Bacteroidetes, nas amostras fecais e da mucosa. Em relação à diversidade de famílias, este autor descreve uma grande diminuição de Enterobacteriaceae (família que representa 63% do total de Proteobacterias nas amostras), Enterococcaceae e aumento relativo de Bacteroidaceae. Deu-se, também, um aumento ligeiro de Lachnospiraceae, mas não o suficiente para ser dado como estatisticamente relevante.

Em 2015, também se verificou à semelhança dos estudos já citados, que existe uma tendência para aquisição da microbiota do dador. Dos dois dadores mais utilizados, naquele que obteve maior sucesso terapêutico, houve enriquecimento nos doentes da sua microbiota com a família Lachnospiraceae e o género *Ruminococcus*, contudo naqueles que usaram o outro dador houve aumento dos géneros *Escherichia* e *Streptococcus*. (Moayyedi et al., 2015b)

5.4 Efeitos adversos

No que concerne aos efeitos adversos na população, dos diversos tratamentos efetuados, pode se considerar, na revisão da literatura sobre o tema, que tais implicações não têm relevo significativo nos dados coligidos que se apresentam (Colman & Rubin, 2014):

Tabela 11- Efeitos adversos descritos após TMF e consulta subsequente. Adaptado de (Colman & Rubin, 2014).

	Via de administração	Efeitos Adversos	Período temporal
Vermeire et al. (2012)	Tubo Nasojejunal (NJ)	* $\frac{3}{4}$ dos doentes apresentaram febre e abdômen mole	*Início no dia do transplante, cessou 2 dias após
Kunde et al. (2013)	Enemas diários (5 dias consecutivos)	*Febre moderada e arrepios (n=1) *Sintomas GI (n=9) *Fadiga (n=3)	*1 doente necessitou de terapêutica antipirética
Kump et al. (2013)	Colonoscopia	*Febre auto-limitada com aumento nas frequência de dejeções	*No próprio dia, autolimitada
Angelberger et al. (2013)	NJ + enema (3 dias consecutivos)	*Febre + aumento da PCR (n=5) *Irritação no local de administração(n=5) *Flatulência (n=2) *Vômitos (n=1)	*No 1º dia após TMF durando até 3º dia. Nota: após febre no primeiro doentes, os restantes receberam metronidazol e alguns probióticos
Zhang et al. (2013)	Gastrosopia	*Aumento de diarreia (n=5)	*Início 3h após o TMF, autolimitada
Suskind et al. (2014)	Tubo Nasogástrico	*Ligeiro inchaço e flatulência (n=3)	*Dia seguinte após TMF
Vaughn et al. (2014)	Colonoscopia	Sem efeitos adversos ou complicações, dentro das 4 semanas após TMF	

Um estudo, em população jovem entre os 7 aos 21 anos de idade, apresentou um caso de um dos sujeitos que não tolerou o enema administrado, um outro desenvolveu febre e arrepios, num período de 3h, após o enema, mas que foi de resolução espontânea (Davidovics & Sylvester, 2013).

Referente a estudos publicados em 2015, Moayyedi et al., relata um doente no grupo placebo ao qual ocorreu exacerbação da sua colite o que levou ao seu internamento na 3ª semana do ensaio, 3 doentes (2 do grupo TMF e 1 do placebo) desenvolveram inflamação e um abscesso retal que necessitou de terapêutica antibiótica e 1 doente no grupo TMF que teve aumento no desconforto abdominal, este último testou positivo para a presença da toxina de *C. difficile*, após a sua saída do estudo.

O efeito adverso proeminente, no ensaio clínico de Rossen et al., foi **borborigmo** passageiro seguido de aumento da frequência de fezes. Houve também relatos de vômitos, em 2 doentes, após o TMF, febre passageira após TMF, também foi mencionada. Na sua maioria, os efeitos adversos foram de resolução espontânea, 2 dias após, inclusive a febre.

Ocorreram, no entanto, efeitos adversos em quatro doentes, sendo um deles diagnosticado com DC, o qual recebeu tratamento, um outro doente apresentou 7 semanas, após TMF, uma infecção por Citomegalovírus que foi declarada sem relacionamento a TMF, o mesmo, para com outro paciente, que foi operado a um carcinoma no cérvix. Por último, um paciente apresentava dores abdominais 11 semanas após o tratamento, este foi admitido no hospital, apresentando resolução espontânea do problema.

5.5 Segurança

Não sendo consensual levando alguns investigadores a especular sobre os sintomas que se observam, no pós TMF, admitindo que o procedimento administrativo tem efeito causal. Não é possível verificar a existência ou não de efeitos imunológicos, a longo prazo, como o início de infeções, pois o tempo em que se acompanha o doente é curto. Devido à componente genética implicada, nas DII e na composição da própria microbiota, a escolha do dador deverá ser investigada com maior profundidade (Colman & Rubin, 2014).

Conclusão

Após dar por concluído este trabalho de investigação, pensamos que as quatro possibilidades terapêuticas apresentadas, pela autora, permitiram clarificar alguns aspetos considerados pertinentes, não obstante ser necessário aprofundar investindo, de forma decisiva, neste campo da investigação com meios e motivação redobrados. No ponto em que qualquer uma delas se encontra, sem qualquer forma de prever o efeito terapêutico, sem uma dose definida ou mesmo um intervalo de tomas ou transplantação, ainda não se sabe o necessário para ser eficiente.

Imunologicamente ainda se encontra tudo um pouco vago em algumas áreas, provavelmente será pertinente chegar ao âmago do porquê de só alguns doentes, após terapêutica, sofrerem uma melhoria e outros não. No TMF foi observado embora se consiga atingir a microbiota do dador, para alguns dos doentes, a capacidade anti-inflamatória induzida pelos microrganismos é insuficiente para se observar melhorias. É necessário definir doses terapêuticas adaptadas a cada sujeito, ou então, a um grupo com base na tipagem microbiológica de amostras fecais.

Em termos de tolerabilidade de todas as terapêuticas, não foram encontrados por parte dos autores citados quaisquer dados que indiquem existir intolerância. A avaliação de risco é um pouco mais complexa, pois os efeitos adversos podem não ser imediatos, pode ser algo que só se verificará uma década depois ou mesmo nunca.

Devido aos efeitos adversos, são necessários estudos prospetivos, que são a forma mais fidedigna de demonstrar efeitos a longo prazo. Realizar estes estudos torna-se uma tarefa complicada devido às amostras de dimensões exíguas, de sujeitos disponíveis para efectuar experiências válidas e a quase inexistência de meios para um acompanhamento continuado e a longo prazo após cada estudo.

É importante partir da noção de que estas são algo já rotineiro e bem instituído em patologias com semelhanças à colite, mas como infelizmente as doenças não são todas iguais o que funciona perfeitamente, para uma, pode precisar de certos ajustes para outra. Este é o caso, os “ajustes” ainda têm de ser encontrados.

Os dados coligidos, em todos os estudos, demonstram melhoria histológica da inflamação e alívio na sintomatologia. Entre os probióticos, prebióticos e simbióticos, os autores tentam diminuir os valores de citoquinas e marcadores como PCR. Na sua maioria todos atingem, em certo grau, uns menos que outros, o sucesso nem que seja num caso particular. A remissão histológica e reparação dos danos, manutenção de

remissões atingidas com o auxílio desta terapêutica, provam ter valor nem que seja pela associação à terapêutica convencional, possivelmente até descendo na escada terapêutica desta em alguns casos. Nesta fase inicial, aplicada à CU, experimentalmente deve-se investir. Pode ser esta a solução em alguns casos de sujeitos refratários.

O transplante de matéria fecal, é um outro tópico com o mesmo objetivo que os anteriores, baseado na mesma base de tratamento que os anteriores. Neste, a bibliografia disponível para esta patologia, é insuficiente em número e, muitas vezes, o conteúdo é extrapolado com base nos dados para ICD ou mesmo DC. O principal problema enfrentado por esta vertente é o declínio da semelhança do microbioma após um período de 12 meses. Inicialmente conseguem que exista praticamente igualdade em composição quantitativa e qualitativa ao dador, mas a degeneração observada levanta questões de duração de tratamentos.

Não existe evidência que o aumento de dose, que por norma é a primeira abordagem, irá alterar esta degeneração. Terá de se partir de um pressuposto que vai de encontro à tipagem fecal inicial dos doentes, para se saber o estado do microbioma previamente ao tratamento. Provavelmente, para alguns doentes, será necessário repetir periodicamente o procedimento, variando este temporalmente com o estado de degeneração ou a sua ausência.

Por ser um processo de colonização e não de estímulo ou crescimento preferencial, como nos anteriores, este acarreta alguns riscos. Como foi descrito o escrutínio necessário para os dadores é essencial para se manter afastada a possibilidade de transmissão de doenças paralelas em conjunto com a seleção fecal.

A conclusão final tirada pela minha parte é que, para além de ser um tema extremamente complexo a nível imunológico, está em falta algum conhecimento teórico o que nem sempre é consensual. No entanto, qualquer uma das formas apresenta muito potencial terapêutico, nem que seja de uma forma auxiliar no início e futuramente poder ser uma opção com menos riscos e efeitos secundários do que apenas a terapêutica farmacológica.

Bibliografia

- Anderson, J. L., Edney, R. J., & Whelan, K. (2012). Systematic review: Faecal microbiota transplantation in the management of inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 36(6), 503–516. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2012.05220.x>
- Angelberger, S., Reinisch, W., Makristathis, A., Lichtenberger, C., Dejaco, C., Papay, P., ... Berry, D. (2013). Temporal Bacterial Community Dynamics Vary Among Ulcerative Colitis Patients After Fecal Microbiota Transplantation. *The American Journal of Gastroenterology*, 108(October 2012), 1–11. <http://doi.org/10.1038/ajg.2013.257>
- Aroniadis, O. C., & Brandt, L. J. (2012). Fecal microbiota transplantation: past, present and future. *Current Opinion in Gastroenterology*, 1. <http://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32835a4b3e>
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., ... Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), 174–180. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature09944>
- Atreya, R., & Neurath, M. F. (2010). Factors Affecting Mucosal Homeostasis: A Fine Balance. In *Inflammatory Bowel Disease* (pp. 52–63). Wiley-Blackwell. <http://doi.org/10.1002/9781444318418.ch6>
- Bäckhed, F., Fraser, C. M. M., Ringel, Y., Sanders, M. E. E., Sartor, R. B. B., Sherman, P. M. M., ... Finlay, B. B. B. (2012). Defining a Healthy Human Gut Microbiome: Current Concepts, Future Directions, and Clinical Applications. *Cell Host & Microbe*, 12(5), 611–622. <http://doi.org/10.1016/j.chom.2012.10.012>
- Bendali, F., Hebraud, M., & Sadoun, D. (2014). Anti-bacterial and anti-adherence activities of a probiotic strain of *Lactobacillus paracasei* against *Listeria monocytogenes*, 2, 52–63.
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., & Gil, A. (2012). Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61(2), 160–174. <http://doi.org/10.1159/000342079>
- Bernstein, C. N. (2014). Treatment of IBD: Where We Are and Where We Are Going. *The American Journal of Gastroenterology*, 110(1), 114–126. <http://doi.org/10.1038/ajg.2014.357>
- Borody, T. J., & Khoruts, A. (2011). Fecal microbiota transplantation and emerging applications. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 9(2), 88–96. <http://doi.org/10.1038/nrgastro.2011.244>
- Brandt, L. J., & Aroniadis, O. C. (2013). An overview of fecal microbiota transplantation: Techniques, indications, and outcomes. *Gastrointestinal*

- Endoscopy*, 78(2), 240–249. <http://doi.org/10.1016/j.gie.2013.03.1329>
- Brownawell, A. M., Caers, W., Gibson, G., Kendall, C. W. C., Lewis, K. D., Ringel, Y., & Slavin, J. L. (2012). Prebiotics and the health benefits of fiber: current regulatory status, future research, and goals., (C). <http://doi.org/10.3945/jn.112.158147>
- Bunnett, N. W., & Lingappa, V. R. (2006). Gastrointestinal Disease. In S. J. McPhee & W. F. Ganong (Eds.), *Pathophysiology of Disease: An Introduction to Clinical Medicine* (5e ed., pp. 380–384). Lange Medical Books.
- Cammarota, G., Ianiro, G., Bibbò, S., & Gasbarrini, A. (2014). Gut microbiota modulation: Probiotics, antibiotics or fecal microbiota transplantation? *Internal and Emergency Medicine*, 9(4), 365–373. <http://doi.org/10.1007/s11739-014-1069-4>
- Cammarota, G., Ianiro, G., Cianci, R., Bibbò, S., Gasbarrini, A., & Currò, D. (2015). The involvement of gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: Potential for therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 149, 191–212. <http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.12.006>
- Chen, W.-X. (2014). Enteric microbiota leads to new therapeutic strategies for ulcerative colitis. *World Journal of Gastroenterology*, 20(42), 15657. <http://doi.org/10.3748/wjg.v20.i42.15657>
- Colman, R. J., & Rubin, D. T. (2014). Fecal microbiota transplantation as therapy for inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Crohn's and Colitis*, 8(12), 1569–1581. <http://doi.org/10.1016/j.crohns.2014.08.006>
- Crittenden, R., & Playne, M. J. (2009). Prebiotics. In Y. K. Lee & S. Salminen (Eds.), *Handbook of Probiotics and Prebiotics* (2nd ed., pp. 533–562). New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Dai, C., Zhao, D. H., & Jiang, M. (2012). VSL#3 probiotics regulate the intestinal epithelial barrier in vivo and in vitro via the p38 and ERK signaling pathways. *International Journal of Molecular Medicine*, 29(2), 202–208. <http://doi.org/10.3892/ijmm.2011.839>
- Damman, C. J., Miller, S. I., Surawicz, C. M., & Zisman, T. L. (2012). The microbiome and inflammatory bowel disease: is there a therapeutic role for fecal microbiota transplantation? *The American Journal of Gastroenterology*, 107(10), 1452–9. <http://doi.org/10.1038/ajg.2012.93>
- Davidovics, Z. H., & Sylvester, F. a. (2013). Medical Stool. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 56(6), 583. <http://doi.org/10.1097/MPG.0b013e318295cc5a>

- De Vrese, M., & Schrezenmeir, J. (2008). Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 111(May), 1–66. http://doi.org/10.1007/10_2008_097
- Dongarrà, M. L., Rizzello, V., Muccio, L., Fries, W., Cascio, A., Bonaccorsi, I., & Ferlazzo, G. (2013). Mucosal immunology and probiotics. *Current Allergy and Asthma Reports*, 13(1), 19–26. <http://doi.org/10.1007/s11882-012-0313-0>
- Elson, C. O., & Weaver, C. T. (2010). In Vivo Models of Inflammatory Bowel Disease. In *Inflammatory Bowel Disease* (pp. 25–51). Wiley-Blackwell. <http://doi.org/10.1002/9781444318418.ch5>
- Floch, M. (2014). Recommendations for Probiotic Use in Humans—A 2014 Update. *Pharmaceuticals*, 7(10), 999–1007. <http://doi.org/10.3390/ph7100999>
- Friedman, S., & Blumberg S., R. (2015). Inflammatory Bowel Disease. In D. Kasper L., A. Fauci S., S. Hauser L., D. Longo L., L. J. Jameson, & J. Loscalzo (Eds.), *Harrison's Principles of Internal Medicine* (19e ed., pp. 1947–1965). New York: McGraw-Hill Education.
- Fujimori, S., Gudis, K., Mitsui, K., Seo, T., Yonezawa, M., Tanaka, S., ... Sakamoto, C. (2009). A randomized controlled trial on the efficacy of synbiotic versus probiotic or prebiotic treatment to improve the quality of life in patients with ulcerative colitis. *Nutrition*, 25(5), 520–525. <http://doi.org/10.1016/j.nut.2008.11.017>
- Furrie, E., Macfarlane, S., Kennedy, a, Cummings, J. H., Walsh, S. V, O'neil, D. a, & Macfarlane, G. T. (2005). Synbiotic therapy (Bifidobacterium longum/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial. *Gut*, 54(2), 242–249. <http://doi.org/10.1136/gut.2004.044834>
- Fuss, I. J., & Strober, W. (2015). *Ulcerative Colitis. Mucosal Immunology*. Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-415847-4.00081-1>
- García-García-de-Paredes, A., Rodríguez-de-Santiago, E., Aguilera-Castro, L., Ferre-Aracil, C., & López-Sanromán, A. (2014). Trasplante de microbiota fecal. *Gastroenterología Y Hepatología*, (xx). <http://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2014.07.010>
- Garg, S., Ahuja, V., Sankar, M., Kumar, a, & Moss, A. (2013). Curcumin for maintenance of remission in ulcerative colitis (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (10).
- Geier, M. S., Butler, R. N., & Howarth, G. S. (2007). Inflammatory bowel disease: Current insights into pathogenesis and new therapeutic options; probiotics, prebiotics and synbiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 115(1), 1–11. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.006>

- Ghouri, Y., Richards, D., Rahimi, E., Krill, J., Jelinek, K., & DuPont, A. (2014). Systematic review of randomized controlled trials of probiotics, prebiotics, and synbiotics in inflammatory bowel disease. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 7, ghouri. <http://doi.org/10.2147/CEG.S27530>
- Gibson, G. R., Scott, K. P., Rastall, R. a., Tuohy, K. M., Hotchkiss, A., Dubert-Ferrandon, A., ... Buddington, R. (2010). Dietary prebiotics: current status and new definition, 7(January), 1–19. <http://doi.org/10.1616/1476-2137.15880>.
- Guandalini, S. (2014). Are Probiotics or Prebiotics Useful in Pediatric Irritable Bowel Syndrome or Inflammatory Bowel Disease? *Frontiers in Medicine*, 1(August), 1–6. <http://doi.org/10.3389/fmed.2014.00023>
- Hanauer, S. B. (2008). Review article: evolving concepts in treatment and disease modification in ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 27, 15–21. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2008.03606.x>
- Haskey, N., & Dahl, W. J. (2006). Synbiotic therapy: a promising new adjunctive therapy for ulcerative colitis. *Nutrition Reviews*, 64(3), 132–138. <http://doi.org/10.1301/nr.2006.janr.132>
- Head, K. a, Jurenka, J. S., & Ascp, M. T. (2003). Inflammatory Bowel Disease Part I : Ulcerative Colitis – Pathophysiology and Conventional and Alternative Treatment Options. *Altern Med Rev*, 8(3), 247–283. Retrieved from http://www.anaturalhealingcenter.com/documents/Thorne/articles/bowel_disease8-3.pdf
- Hegazy, S. K., & El-Bedewy, M. M. (2010). Effect of probiotics on pro-inflammatory cytokines and NF- κ B activation in ulcerative colitis. *World Journal of Gastroenterology*, 16(33), 4145–4151. <http://doi.org/10.3748/wjg.v16.i33.4145>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., ... Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 11(8), 506–514. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Hirano, J., Yoshida, T., Sugiyama, T., Koide, N., Mori, I., & Yokochi, T. (2003). The effect of Lactobacillus rhamnosus on enterohemorrhagic Escherichia coli infection of human intestinal cells in vitro. *Microbiology and Immunology*, 47(6), 405–409.
- Ho, J. T., Chan, G. C., & Li, J. C. (2015). Systemic effects of gut microbiota and its relationship with disease and modulation. *BMC Immunology*, 16(1), 1–6. <http://doi.org/10.1186/s12865-015-0083-2>
- Hojsak, I., & Shamir, R. (2013). Safety of probiotics. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 107, 161–170. <http://doi.org/10.1159/000345744>

- Hui, Y. H. (2006). *Handbook of Food Products Manufacturing. Handbook of Food Products Manufacturing* (Vol. 1–2). <http://doi.org/10.1002/9780470113554>
- Hummel, S., Veltman, K., Cichon, C., Sonnenborn, U., & Schmidt, M. A. (2012). Differential targeting of the E-cadherin/??-catenin complex by gram-positive probiotic lactobacilli improves epithelial barrier function. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4), 1140–1147. <http://doi.org/10.1128/AEM.06983-11>
- Ioannidis, O., Varnalidis, I., Paraskevas, G., & Botsios, D. (2011). Nutritional modulation of the inflammatory bowel response. *Digestion*, 84(2), 89–101. <http://doi.org/10.1159/000323456>
- Ishikawa, H., Akedo, I., Umesaki, Y., Tanaka, R., Imaoka, A., & Otani, T. (2003). Randomized Controlled Trial of the Effect of Bifidobacteria-Fermented Milk on Ulcerative Colitis. *Journal of the American College of Nutrition*, 22(1), 56–63. <http://doi.org/10.1080/07315724.2003.10719276>
- Johnson-Henry, K. C., Donato, K. a., Shen-Tu, G., Gordanpour, M., & Sherman, P. M. (2008). Lactobacillus rhamnosus strain GG prevents enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7-induced changes in epithelial barrier function. *Infection and Immunity*, 76(4), 1340–1348. <http://doi.org/10.1128/IAI.00778-07>
- Kaiko, G. E., & Stappenbeck, T. S. (2014). Host–microbe interactions shaping the gastrointestinal environment. *Trends in Immunology*, 35(11), 538–548. <http://doi.org/10.1016/j.it.2014.08.002>
- Kasper, D., Fauci, A., Hauser, S., Longo, D., & Jameson, J. (2015). *Harrison's Principles of Internal Medicine* (19th ed.). New York: McGraw-Hill Education.
- Kelly, C. R., Kahn, S., Kashyap, P., Laine, L., Rubin, D., Atreja, A., ... Wu, G. (2015). Update on Fecal Microbiota Transplantation 2015: Indications, Methodologies, Mechanisms, and Outlook. *Gastroenterology*, 149(1), 223–237. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.05.008>
- Khoruts, A., & Weingarden, A. R. (2014). Emergence of fecal microbiota transplantation as an approach to repair disrupted microbial gut ecology. *Immunology Letters*, 162(2), 1–5. <http://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.07.016>
- Kostic, A. D., Xavier, R. J., & Gevers, D. (2014). The microbiome in inflammatory bowel disease: Current status and the future ahead. *Gastroenterology*, 146(6), 1489–1499. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.02.009>
- Kruis, W., Fric, P., Pokrotnieks, J., Lukás, M., Fixa, B., Kascák, M., ... Schulze, J. (2004). Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic Escherichia coli Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut*, 53(11), 1617–23. <http://doi.org/10.1136/gut.2003.037747>

- Kump, P. K., Gröchenig, H.-P., Lackner, S., Trajanoski, S., Reicht, G., Hoffmann, K. M., ... Högenauer, C. (2013). Alteration of intestinal dysbiosis by fecal microbiota transplantation does not induce remission in patients with chronic active ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.*, 19(10), 2155–2165. <http://doi.org/10.1097/MIB.0b013e31829ea325>
- Macfarlane, G. T., Furrie, E., & Macfarlane, S. (2004). Bacterial Milieu and Mucosal Bacteria in Ulcerative Colitis. In *Inflammatory Bowel Disease: Crossroads of Microbes, Epithelium and Immune Systems* (pp. 57–70). John Wiley & Sons, Ltd. <http://doi.org/10.1002/0470090480.ch5>
- Mack, D. R., Michail, S., Wei, S., McDougall, L., & Hollingsworth, M. a. (1999). Probiotics inhibit enteropathogenic E. coli adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *The American Journal of Physiology*, 276(4 Pt 1), G941–G950.
- Magro, F., Cremers, E. B. I., Correia, L., Cotter, J., Duarte, M. A., Lago, P., ... Vieira, A. I. (2011). Terapêutica de Manutenção da Remissão na Colite Ulcerosa Moderada a Grave Maintenance Therapy in Moderate to Severe Ulcerative Colitis, 18, 170–178.
- Major, G., & Spiller, R. (2014). Irritable bowel syndrome, inflammatory bowel disease and the microbiome. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity*, 21(1), 15–21. <http://doi.org/10.1097/MED.0000000000000032>
- Mallon, P., McKay, D., Kirk, S., & Gardiner, K. (2007). Probiotics for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (4). <http://doi.org/10.1002/14651858.CD005573.pub2>
- Marteau, P., & Camus, M. (2011). Probiotiques et maladies inflammatoires cryptogénétiques de l'intestin. *Phytothérapie*, 9(2), 113–116. <http://doi.org/10.1007/s10298-011-0614-9>
- Matsuoka, K., Mizuno, S., Hayashi, A., & Hisamatsu, T. (2014). Fecal Microbiota Transplantation for Gastrointestinal Diseases, 69–74. <http://doi.org/10.2302/kjm.2014-0006-RE>
- Matthes, H., Krummenerl, T., Giensch, M., Wolff, C., & Schulze, J. (2010). Clinical trial: probiotic treatment of acute distal ulcerative colitis with rectally administered Escherichia coli Nissle 1917 (EcN). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10, 13. <http://doi.org/10.1186/1472-6882-10-13>
- Moayyedi, P., Surette, M. G., Kim, P. T., Libertucci, J., Wolfe, M., Onischi, C., ... Lee, C. H. (2015a). Fecal Microbiota Transplantation Induces Remission in Patients With Active Ulcerative Colitis in a Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology*, 149(1), 102–109.e6. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.04.001>
- Moayyedi, P., Surette, M. G., Kim, P. T., Libertucci, J., Wolfe, M., Onischi, C., ... Lee,

- C. H. (2015b). Fecal Microbiota Transplantation Induces Remission in Patients with Active Ulcerative Colitis in a Randomized, Controlled Trial. *Gastroenterology*, 149(1), 102–109.e6. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.04.001>
- O'Toole, P. W., & Claesson, M. J. (2010). Gut microbiota: Changes throughout the lifespan from infancy to elderly. *International Dairy Journal*, 20(4), 281–291. <http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.11.010>
- Ocón, B., Anzola, A., Ortega-González, M., Zarzuelo, A., Suárez, M. D., Sánchez De Medina, F., & Martínez-Augustín, O. (2013). Active hexose-correlated compound and Bifidobacterium longum BB536 exert symbiotic effects in experimental colitis. *European Journal of Nutrition*, 52(2), 457–466. <http://doi.org/10.1007/s00394-012-0347-z>
- Oliva, S., Di Nardo, G., Ferrari, F., Mallardo, S., Rossi, P., Patrizi, G., ... Stronati, L. (2012). Randomised clinical trial: The effectiveness of Lactobacillus reuteri ATCC 55730 rectal enema in children with active distal ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 35(3), 327–334. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04939.x>
- Parassol, N., Freitas, M., Thoreux, K., Dalmasso, G., Bourdet-Sicard, R., & Rampal, P. (2005). Lactobacillus casei DN-114 001 inhibits the increase in paracellular permeability of enteropathogenic Escherichia coli-infected T84 cells. *Research in Microbiology*, 156(2), 256–262. <http://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.09.013>
- Patel, R., & DuPont, H. L. (2015). New Approaches for Bacteriotherapy: Prebiotics, New-Generation Probiotics, and Synbiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 60(suppl 2), S108–S121. <http://doi.org/10.1093/cid/civ177>
- Persborn, M., Gerritsen, J., Wallon, C., Carlsson, a., Akkermans, L. M. a, & Söderholm, J. D. (2013). The effects of probiotics on barrier function and mucosal pouch microbiota during maintenance treatment for severe pouchitis in patients with ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 38(7), 772–783. <http://doi.org/10.1111/apt.12451>
- Quigley, E. M. (2011). Gut microbiota and the role of probiotics in therapy. *Current Opinion in Pharmacology*, 11(6), 593–603. <http://doi.org/10.1016/j.coph.2011.09.010>
- Quigley, E. M. M. (2010). Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. *Pharmacological Research*, 61(3), 213–218. <http://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.01.004>
- Rossen, N. G., Fuentes, S., van der Spek, M. J., Tijssen, J., Hartman, J. H. a., Duflou, A., ... Ponsioen, C. Y. (2015). Findings from a Randomized Controlled Trial of Fecal Transplantation for Patients with Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*, 110–118. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.03.045>

- Ruff, W. E., & Kriegel, M. a. (2015). Autoimmune host–microbiota interactions at barrier sites and beyond. *Trends in Molecular Medicine*, 21(4), 233–244. <http://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.02.006>
- Ryan, J., Sibartie, S., O'Mahony, L., & Shanahan, F. (2007). Functional Foods and Gastrointestinal Disorders. In *Handbook of Food Products Manufacturing* (pp. 153–174). John Wiley & Sons, Inc. <http://doi.org/10.1002/9780470113554.ch54>
- Sanders, M. E., Guarner, F., Guerrant, R., Holt, P. R., Quigley, E. M. M., Sartor, R. B., ... Mayer, E. a. (2013). An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. *Gut*, 62(5), 787–96. <http://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302504>
- Satsangi, J., Silverberg, M. S., Vermeire, S., & Colombel, J. (2006). The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*, 55(6), 749–753. <http://doi.org/10.1136/gut.2005.082909>
- Scaldaferri, F., Gerardi, V., Lopetuso, L. R., Del Zompo, F., Mangiola, F., Boškoski, I., ... Gasbarrini, A. (2013). Gut microbial flora, prebiotics, and probiotics in IBD: Their current usage and utility. *BioMed Research International*, 2013. <http://doi.org/10.1155/2013/435268>
- Scott, K. P., Gratz, S. W., Sheridan, P. O., Flint, H. J., & Duncan, S. H. (2013). The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacological Research*, 69(1), 52–60. <http://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.10.020>
- Servin, A. L., & Coconnier, M.-H. (2003). Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17(5), 741–754. [http://doi.org/10.1016/S1521-6918\(03\)00052-0](http://doi.org/10.1016/S1521-6918(03)00052-0)
- Simeoli, R., Raso, G. M., Lama, A., Pirozzi, C., Santoro, A., Guida, F. Di, ... Meli, R. (2015). Preventive and Therapeutic Effects of Lactobacillus Paracasei B21060 – Based Synbiotic Treatment on Gut Inflammation and Barrier Integrity in Colitic Mice 1 – 3, (C), 1–9. <http://doi.org/10.3945/jn.114.205989.1>
- Slavin, J. (2013). Fiber and prebiotics: Mechanisms and health benefits. *Nutrients*, 5(4), 1417–1435. <http://doi.org/10.3390/nu5041417>
- Smits, L. P., Bouter, K. E. C., De Vos, W. M., Borody, T. J., & Nieuwdorp, M. (2013). Therapeutic potential of fecal microbiota transplantation. *Gastroenterology*, 145(5), 946–953. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.08.058>
- Sood, A., Midha, V., Makharia, G. K., Ahuja, V., Singal, D., Goswami, P., & Tandon, R. K. (2009). The probiotic preparation, VSL#3 induces remission in patients with mild-to-moderately active ulcerative colitis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology : The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 7(11), 1202–9, 1209.e1. <http://doi.org/10.1016/j.cgh.2009.07.016>

- Tuohy, K. M., Probert, H. M., Smejkal, C. W., & Gibson, G. R. (2003). Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discovery Today*, 8(15), 692–700. [http://doi.org/10.1016/S1359-6446\(03\)02746-6](http://doi.org/10.1016/S1359-6446(03)02746-6)
- Tursi, A., Brandimarte, G., Giorgetti, G. M., Forti, G., Modeo, M. E., & Gigliobianco, A. (2004). Low-dose balsalazide plus a high-potency probiotic preparation is more effective than balsalazide alone or mesalazine in the treatment of acute mild-to-moderate ulcerative colitis. *Medical Science Monitor*, 10(11), 126–131. <http://doi.org/http://dx.doi.org/>
- Utrilla, M. P., Peinado, M. J., Ruiz, R., Rodriguez-Nogales, A., Algieri, F., Rodriguez-Cabezas, M. E., ... Rubio, L. a. (2015). Pea (*Pisum sativum* L.) seed albumin extracts show anti-inflammatory effect in the DSS model of mouse colitis. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59(4), 807–819. <http://doi.org/10.1002/mnfr.201400630>
- Venugopalan, V., Shriner, K. a., & Wong-Beringer, A. (2010). Regulatory oversight and safety of probiotic use. *Emerging Infectious Diseases*, 16(11), 1661–1665. <http://doi.org/10.3201/eid1611.100574>
- Vermeire, S., McGovern, D. P., Van Assche, G., & Rutgeerts, P. (2010). Genetics of Inflammatory Bowel Disease: How Modern Genomics Informs Basic, Clinical and Translational Science. In *Inflammatory Bowel Disease* (pp. 16–24). Wiley-Blackwell. <http://doi.org/10.1002/9781444318418.ch4>
- Vieira, A. T., Teixeira, M. M., & Martins, F. S. (2013). The role of probiotics and prebiotics in inducing gut immunity. *Frontiers in Immunology*, 4(DEC), 1–12. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00445>
- Vrieze, a., De Groot, P. F., Kootte, R. S., Knaapen, M., Van Nood, E., & Nieuwdorp, M. (2013). Fecal transplant: A safe and sustainable clinical therapy for restoring intestinal microbial balance in human disease? *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, 27(1), 127–137. <http://doi.org/10.1016/j.bpg.2013.03.003>
- Walujkar, S. a, Dhotre, D. P., Marathe, N. P., Lawate, P. S., Bharadwaj, R. S., & Shouche, Y. S. (2014). Characterization of bacterial community shift in human Ulcerative Colitis patients revealed by Illumina based 16S rRNA gene amplicon sequencing. *Gut Pathogens*, 6(1), 22. <http://doi.org/10.1186/1757-4749-6-22>
- Warinner, C., Speller, C., Collins, M. J., & Lewis, C. M. (2015). Ancient human microbiomes. *Journal of Human Evolution*, 79, 125–136. <http://doi.org/10.1016/j.jhevol.2014.10.016>
- WGO. (2008). Probiotics and prebiotics. In *World Gastroenterology Organisation Practice Guidelines* (pp. 1–22). <http://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32834b8082>
- WGO. (2011). Probióticos e prebióticos. In *World Gastroenterology Organisation*

- Practice Guidelines* (pp. 1–29). Retrieved from <http://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/probiotics-and-prebiotics>
- Wildt, S., Nordgaard, I., Hansen, U., Brockmann, E., & Rumessen, J. J. (2011). A randomised double-blind placebo-controlled trial with *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Journal of Crohn's & Colitis*, 5(2), 115–21. <http://doi.org/10.1016/j.crohns.2010.11.004>
- Williams, N. T. (2010). Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacy : AJHP : Official Journal of the American Society of Health-System Pharmacists*, 67(6), 449–458. <http://doi.org/10.2146/ajhp090168>
- Xu, X., Xu, P., Ma, C., Tang, J., & Zhang, X. (2013). Gut microbiota, host health, and polysaccharides. *Biotechnology Advances*, 31(2), 318–337. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.12.009>
- Yoshimatsu, Y., Yamada, A., Furukawa, R., Sono, K., Osamura, A., & Nakamura, K. (2015). Effectiveness of probiotic therapy for the prevention of relapse in patients with inactive ulcerative colitis, 21(19), 5985–5994. <http://doi.org/10.3748/wjg.v21.i19.5985>
- Zocco, M. a, dal Verme, L. Z., Cremonini, F., Piscaglia, a C., Nista, E. C., Candelli, M., ... Gasbarrini, a. (2006). Efficacy of *Lactobacillus* GG in maintaining remission of ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 23(11), 1567–1574. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2006.02927.x>